

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von hybriden OmpF-Poren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Simon Reitz
aus Kleingladenbach

Marburg/Lahn 2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen von November 2005 bis Mai 2009 an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am: _____

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Ulrich Koert

Tag der mündlichen Prüfung am: _____

Der Hauptteil dieser Arbeit wurde in folgendem Artikel publiziert:

On the Function and Structure of Synthetically Modified Porins.

Reitz, S., Cebi, M., Reiss, P., Studnik, G., Linne, U., Koert, U., and Essen, L.-O. (2009) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 4853-4857.

Im Verlauf der Promotion wurde weiterhin folgender Artikel veröffentlicht:

Structural and Kinetic Properties of a β -Hydroxyacid Dehydrogenase Involved in Nicotinate Fermentation.

Reitz, S., Alhapel, A., Essen, L.-O. and Pierik, A.J. (2008) *JMB*, **382**, 802-811.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Thema:

"Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von
hybriden OmpF-Poren"

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als den von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

Simon Reitz

Zusammenfassung

Das gram-negative Bakterium *Escherichia coli* verfügt über eine äußere Membran, die als ein Schutzschild gegenüber der Zellumgebung dient. Hier ist das trimere Matrixporin OmpF lokalisiert, das eine β -Fass-artige Form einnimmt, und an seiner Engstelle durch die Schleife L3 auf einen Durchmesser von $7 \times 11 \text{ \AA}$ begrenzt wird. Dieses Protein wurde als Templat für die Erzeugung hybrider Ionenkanäle ausgewählt, die durch die Anwendung zwei verschiedener Strategien synthetisch modifiziert werden sollten. Die daraus resultierenden veränderten Eigenschaften wurden mittels *Black Lipid Membrane*-Messungen (BLM) an einzelnen Kanälen sowie durch strukturelle Untersuchungen bestimmt.

Die erste Strategie bestand in der Teilung des Proteins in ein N-terminales Peptid, das festphasensynthetisch erzeugt wurde, sowie ein rekombinant überproduziertes C-terminales Polypeptid. Die Festphasensynthese erlaubte den Einbau einer nicht-natürlichen Aminosäure. Diese verfügte über eine funktionelle Alkin-Gruppe, an die durch Anwendung der [3+2]-Click-Chemie das fluoreszierende Dansylazid unter Bildung eines Triazolrings angeknüpft wurde. Im Anschluss daran wurden beide Fragmente in 8 M Harnstoff durch die Native Chemische Ligation (NCL) miteinander verknüpft.

Die zweite Strategie sah die ortsspezifische Mutagenese ausgewählter Reste in ein Cystein vor, an die Iodacetamid-aktivierte Modulatoren angeknüpft werden konnten. So wurde an die Thiolgruppe neben der Dansylverbindung eine Dibenzo-18-Krone-6 angebracht. Die über beide Strategien generierten hybriden OmpF-Poren wurden durch schnelle Verdünnung in eine vesikelhaltige Suspension zurückgefaltet.

Die Einzelkanalmessungen der Referenz-Proteine ergaben, dass deren Leitfähigkeiten keine signifikante Abweichung gegenüber dem membranextrahiertem Wildtyp-Protein mit einer Leitfähigkeit von $0.99 \pm 0.02 \text{ nS}$ aufwiesen, und folglich geeignete Strategien zur Erzeugung naturähnlicher Ionenkanäle waren.

Es stellte sich heraus, dass neben der Beschaffenheit des Modulators und der Lage in der Pore ebenfalls die Art der Anknüpfungsreaktion entscheidend für eine Leitfähigkeitsänderung war. So zeigten die über die zweite Strategie erzeugten hybriden OmpF-Kanäle eine deutliche Heterogenität in den erhaltenen Leitfähigkeitsniveaus mit einer gemittelten Reduktion der Leitfähigkeit von 16-19%, während das über [3+2]-Click-Chemie erhaltene Dansylhybrid keine signifikante Änderung zeigte. Der Dansyl-Modulator zeigte eine starke Ortsabhängigkeit, da die Anknüpfung an Cysteine, die nur $\sim 5 \text{ \AA}$ voneinander entfernt lagen, einen drastischen Effekt bei den beobachteten Leitfähigkeitsniveaus ausmachte.

Durch Kristallisation des OmpF-Kronenether-Hybrids konnte eine neue trigonale Kristallform beobachtet werden. Durch röntgenkristallographische Vermessung dieser Kristalle bis zu einer Auflösung von 3.2 \AA wurde die Konformation des Modulators in der Pore aufgeklärt. Die gefundene *inward*-Orientierung wird durch elektrostatische Wechselwirkungen der Sauerstoff-Atome der Ethyleneinheiten mit polaren Aminosäuren des Poreninneren stabilisiert und ist daher verantwortlich für eine partielle Blockade der Pore.

Summary

The gram-negative bacterium *Escherichia coli* exhibits a so-called outer membrane, which acts as a barrier against the cell environment. Here, the trimeric matrix porin OmpF is located. The porin forms a β -barrel like structure and is restricted to $7 \times 11 \text{ \AA}$ at the eyelet due to loop region L3. This protein was used as a template for generating hybrid ion-channels. Two different modification strategies were employed, and the resulting pore properties were characterised by single channel measurements via the *Black Lipid Membrane* method (BLM) and crystallographic analysis.

The first modification strategy is based on splitting the protein into an N-terminal fragment, which is synthesized by *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS), whereas the C-terminal polypeptide is produced by recombinant means. The synthesis of the N-terminal peptide allows the incorporation of a non-natural amino acid comprising an alkyne moiety. By using [3+2]-Click-Chemistry, the fluorophore dansylazide was coupled to the alkyne modified peptide. Subsequent ligation via *Native Chemical Ligation* (NCL) under 8 M urea yielded full-length OmpF.

To perform the second strategy several cysteine residues were introduced into OmpF by site-directed mutagenesis. Two different iodoacetamide-activated modulators, the above mentioned dansyl-compound and a dibenzo-18-crown-6-derivative, were coupled to OmpF via an S-alkylation reaction. Hybrid OmpF pores generated by both strategies were refolded by rapid dilution into a vesicle containing suspension.

Single channel measurements of the refolded reference OmpF proteins showed clearly that their conductance is comparable to wild type OmpF ($0.99 \pm 0.02 \text{ nS}$) extracted from cell envelopes. This demonstrates that both strategies are valid routes for obtaining nature-like hybrid ion-channels.

It was found, that, beside the properties of the modulator and the attachment site in the pore, the way of generating the hybrids was crucial for modulating the ion current. The produced hybrid ion-channels via S-alkylation exhibited a strong distribution of measured conductance levels, which corresponds to a reduction by 16-19% compared to the wild type. Surprisingly, the dansylhybrid derived by [3+2]-Click-Chemistry showed no significant alteration of its conductance. The dansyl-modulator was also introduced in a site-dependent fashion, and a distance of only $\sim 5 \text{ \AA}$ was sufficient to change the effect of conductance levels dramatically.

The crystallisation of the crown-ether hybrid yielded a novel crystal form. X-ray analysis with a resolution of up to 3.2 \AA revealed an *inward*-oriented crown-ether conformation. This orientation is strongly stabilized by electrostatic contacts between the ethylene oxygen atoms and several acidic and basic side chains of the inner porin wall, which causes partial blockage of the pore.

Abkürzungen und Fachbegriffe

α	Wellenlänge	h	Stunde
Da	Dalton	HEPES	<i>N</i> -[2-Hydroxyl]piperazin- <i>N'</i> -[2-ethansulfonsäure]
μ	mikro	HOAc	Essigsäure
Å	Ångström (= 10^{-10} m)	HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
aa	Aminosäure	HBTU	O-Benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
Abb.	Abbildung		
Amp^{xx}	Ampicillin, xx = Konzentration in µg/mL		
Bp	Basenpaar	Hz	Hertz
BM(PEG)₃	1,11-Bis-Maleimidtriethylenglykol	IEX	<i>Ion exchange chromatography</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
C₈(HE)SO	Octyl(hydroxyethan)sulfoxid	Kan^{xx}	Kanamycin, xx = Konzentration in µg/mL
DEAE	Diethylaminoethylen	kb	Kilo-Basenpaar
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron	LB-Medium	Luria Bertani-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid	m	Meter/Milli-
DNA	Desoxyribonukleinsäure	M	Molar
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat	min	Minute(n)
DTT	Dithiothreitol	MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	MOPS	4-Morpholinpropan-sulfonsäure
DDM	n-Dodecyl-β-D-maltosid	MES	2-(N-Morpholin)ethansulfonsäure
DTT	Dithiothreitol	MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	MPAA	4-(Carboxymethyl)thiophenol
DCM	Dichlormethan	OD_x	optische Dichte bei x nm
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyl-ethylamin	octyl-POE	n-Octylpolyoxyethylen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
EB	<i>Elution buffer</i>	PEG	Polyethylenglycol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	rpm	<i>revolutions per minute</i>
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid	r.m.s.d.	<i>root mean square deviation</i>
eq	Äquivalent(e)	TLCK	<i>N</i> _α -Tosyl-L-lysin chloromethylketon
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>	TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>	TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl	TFA	Trifluoressigsäure
g	Gramm / Erdbeschleunigung	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
gA	Gramicidin A	Triton X-100	<i>t</i> -Octylphenoxypolyethoxyethanol

Proteinogene Aminosäuren: Abkürzungen und relative Molmasse

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode	M _r [g/mol]
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamat	Glu	E	147
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1.	<i>Outer membrane proteins (Omp)</i>	1
1.1.1.	Biogenese der äußeren Membranproteine gram-negativer Bakterien	5
1.1.2.	Regulation der Gen-Expression der Porine	7
1.1.3.	Funktionen der <i>Outer membrane proteins</i>	9
1.1.4.	Allgemeiner Aufbau der β -Fass-artigen Porine	11
1.1.5.	Der Aufbau des generellen Porins OmpF	12
1.1.6.	Eine Ausnahme: Der spannungsabhängige Anionen-Kanal (VDAC) der äußeren Mitochondrienmembran	15
1.2.	<i>Protein engineering</i> und chemisch modifizierte Ionenkanäle	17
1.2.1.	Beispiele für das <i>re-design</i> von Ionenkanälen	18
1.2.2.	Beispiele für das <i>de novo</i> design von Ionenkanälen	29
1.2.3.	Anwendungsgebiete modifizierter Ionenkanäle	32
1.3.	OmpF als Templatstruktur zur Erzeugung synthetisch modifizierter Biohybride	33
1.4.	Zielsetzung	33
2	Material	35
2.1.	Geräte	35
2.2.	Chemikalien, Enzyme und weitere Verbrauchsmaterialien	37
2.3.	Vektoren	39
2.4.	Mikroorganismen	40
2.4.1.	<i>E. coli</i> DH5 α	40
2.4.2.	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Gold	40
2.4.3.	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Gold omp8 und omp9	40
2.5.	Medium	41
2.6.	Antibiotika	41
3	Methoden	42
3.1.	Molekularbiologische Methoden	42
3.1.1.	Herstellung der Expressions-Plasmide	42
3.1.2.	Ortsspezifische Mutagenese und Konstruktion von Cystein-Mutanten	43
3.1.3.	DNA-Sequenzierung	45
3.1.4.	Präparation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	45
3.1.5.	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	46
3.1.6.	Präparation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	46
3.1.7.	Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	47
3.2.	Proteinchemische Methoden	47

3.2.1.	Homologe Genexpression	47
3.2.1.1.	Expression des nativen membranständigen OmpF	47
3.2.1.2.	Expression der OmpF-Proteinfragmente und -Mutanten	48
3.2.2.	Aufreinigung des nativen membranständigen OmpF	48
3.2.3.	Aufreinigung der OmpF-Proteinfragmente und -Mutanten in Form von <i>inclusion bodies</i>	49
3.2.4.	Reinigung von Reaktionsansätzen durch Entsalzungssäulen	49
3.2.5.	Dialyse von denaturiertem und nativem OmpF	50
3.2.6.	Rückfaltung von denaturiertem OmpF	50
3.2.7.	Vorreinigung durch tryptischen Verdau	51
3.2.8.	Reinigung durch Ionenaustauscherchromatographie (IEX)	51
3.2.9.	Reinigung durch SDS-PAGE-Extraktion	52
3.2.10.	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
3.3.	Festphasen-Peptidsynthese (<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i> , SPPS)	53
3.3.1.	Die einzelnen Reaktionsschritte der Peptidsynthese:	54
3.3.1.1.	Initiation	54
3.3.1.2.	Elongation	54
3.3.1.3.	Termination	56
3.3.2.	Reinigung und Peptidyl-Thioester-Kupplung der Peptide	56
3.4.	Native Chemische Ligation (NCL)	57
3.5.	[3+2]-Click-Reaktion	59
3.6.	S-Alkylierung an Cystein-Reste durch synthetische Modulatoren	62
3.7.	2-Punkt-Anknüpfungsreaktionen an Cystein-Doppelmutanten	63
3.8.	CD-Spektroskopie	64
3.9.	Funktionelle Charakterisierung durch <i>Black Lipid Membrane</i> -Messungen (BLM)	65
3.10.	Proteinkristallisation und Strukturbestimmung	66
3.10.1.	Probenvorbereitung	66
3.10.2.	Kristallisation durch <i>sitting-drop</i>	67
3.10.3.	Kristallisation durch Mikrodialyse	67
3.10.4.	Crypuffer-Test an der Kupferdrahanode-Röntgenquelle	68
3.10.5.	Datensammlung und Datenreduktion	68
3.10.6.	Modellbau und Strukturverfeinerung	69
3.10.7.	Graphische Darstellung	69
3.11.	Massenspektrometrische Analytik	69
4	Ergebnisse	71
4.1.	Synthese der Peptid-Bausteine für die Native Chemische Ligation	71
4.2.	Übersicht über synthetische Modulatoren zur Erzeugung hybrider OmpF-Poren	73
4.2.1.	Azido-Bausteine zur Anknüpfung mittels [3+2]-Click-Chemie	73
4.2.2.	Iodacetamid-Bausteine zur Anknüpfung mittels S-Alkylierung	74
4.2.3.	Maleimid-Baustein zur Anknüpfung an Cysteine mittels Additionsreaktion	75

4.3.	Expression und Aufreinigung...	75
4.3.1.	...des membranständigen OmpF	75
4.3.2.	...des nativen OmpF in Form von <i>inclusion bodies</i>	76
4.3.3.	...der OmpF-Deletions- und Cystein-Mutanten in Form von <i>inclusion bodies</i>	77
4.4.	Ergebnisse der Nativen Chemischen Ligation	79
4.5.	S-Alkylierungsreaktionen an Cystein-Mutanten von OmpF	81
4.5.1.	S-Alkylierung von OmpF-K16C mit Dansyl-Iodacetamid 19	82
4.5.2.	S-Alkylierung von OmpF-K16C mit der Dibenzo-18-Krone-6 17	84
4.6.	[3+2]-Click-Reaktion	85
4.6.1.	...an OmpF, erzeugt durch NCL und modifiziert mit Propargyltyrosinether II	85
4.6.2.	...an OmpF-Cystein-Mutanten, die bereits durch den Iodacetamid-Alkin-Linker 18 modifiziert waren	88
4.7.	Rückfaltungs- und Kontrollexperimente	92
4.8.	2-Punkt-Anknüpfungs-Experimente mit Bis-Maleimid-Linker	96
4.9.	Funktionelle Charakterisierung hybrider OmpF-Poren	101
4.9.1.	Leitfähigkeitsmessungen an membran-extrahiertem und rückgefaltetem OmpF	102
4.9.2.	Leitfähigkeitsmessungen an OmpF-Referenz-Molekülen zur NCL und S-Alkylierung	103
4.9.3.	Leitfähigkeitsmessungen an hybriden OmpF-Kanälen, erzeugt durch	105
4.9.3.1.	...Native Chemische Ligation kombiniert mit [3+2]-Click-Reaktion	105
4.9.3.2.	...S-Alkylierung an der K16C-Cystein-Mutante	107
4.9.3.3.	...S-Alkylierung und [3+2]-Click-Reaktion an vier verschiedenen Cystein-Mutanten	108
4.9.4.	Tabellarische Übersicht der gemessenen Leitfähigkeiten	110
4.10.	Strukturelle Charakterisierung hybrider OmpF-Poren	112
4.10.1.	Kristallisation von Wildtyp OmpF durch <i>sitting drop</i> -Kristallisation	112
4.10.2.	Kristallisation von Wildtyp OmpF durch Mikrodialyse	113
4.10.3.	Kristallisation von OmpF-K16C mit kovalent verknüpfter Dibenzo-18-Krone-6 (17)	114
4.10.4.	Datensammlung und Strukturverfeinerung von OmpF-Cys16- 17	115
4.10.5.	Die Kristallstruktur von OmpF-Cys16- 17	119
4.10.6.	PDB-Eintrag der Kristallstruktur von OmpF-Cys16- 17	120
5	Diskussion	121
5.1.	SPPS/NCL/[3+2]-Click-Chemie und S-Alkylierung als Methoden zur Erzeugung hybrider OmpF-Poren	121
5.2.	Die Kristallisation von nativem und modifiziertem OmpF	122
5.3.	Zur Struktur und Funktion hybrider OmpF-Poren	124
5.3.1.	Elektrophysiologische Eigenschaften von OmpF	124
5.3.2.	Hybride OmpF-Moleküle zeugen von einer starken Heterogenität	126
5.3.3.	Die Art der Anknüpfung von synthetischen Modulatoren beeinflusst das Messergebnis	129
5.3.4.	Die Lage des Anknüpfungspunktes von synthetischen Modulatoren beeinflusst das Messergebnis	132

5.4.	Alternative Strategien zur Erzeugung hybrider OmpF-Poren.....	134
5.5.	OmpG: ein alternatives Modellsystem für hybride Ionenkanäle	135
5.6.	Anwendungsbeispiele modifizierter Ionenkanäle	137
5.7.	Ausblick	141
6	Literatur	144
7	Anhang	155
7.1.	Massenspektrometrische Analytik	155
7.1.1.	Analytik der NCL.....	157
7.1.2.	Analytik der NCL / [3+2]-Click-Reaktion, Produkt 28	158
7.1.3.	Analytik der S-Alkylierungsreaktion von OmpF-K16C.....	158
7.1.4.	Analytik der Proben aus Kapitel 4.6.2, Produkte 29b und 30a-d , entsprechend der S-Alkylierung mit 18 und [3+2]-Click-Reaktion mit 13	159
7.2.	Verwendete stereochemische Parameter für die Verfeinerung der Dibenzo-18-Krone-6 .	160
8	Danksagung.....	162

1 Einleitung

1.1. Outer membrane proteins (Omp)

Bakterien werden je nach Beschaffenheit ihrer Zellwand aus historischen Gründen in zwei Gruppen eingeteilt, die auf der unterschiedlichen Anfärbung mit kationischen Farbstoffen, z. B. Kristallviolett, beruht (**Abb. 1.1 A**). Die so genannten gram-positiven Bakterien, die durch die Farbstoffe permanent angefärbt werden, besitzen neben der cytosolischen Membran

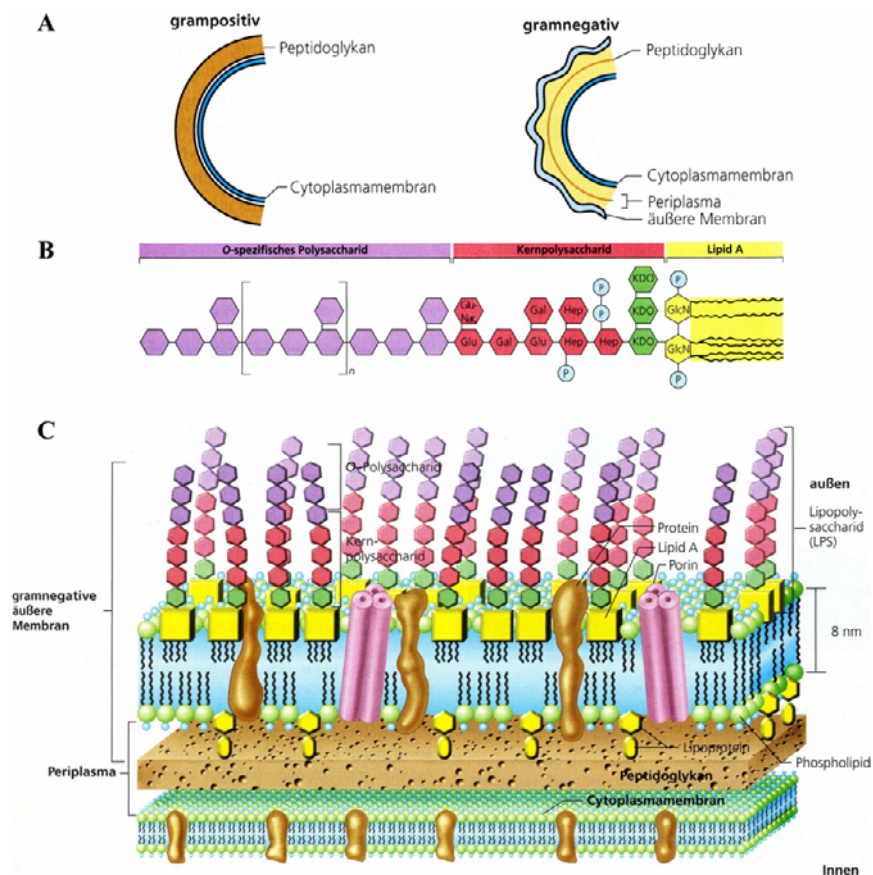


Abbildung 1.1: Die Bakterienzellwand. (A) Gram-positive und gram-negative Zellwand als Vergleich. (B) Schematischer Aufbau von Lipopolysacchariden. (C) Detailliertes Schema der gram-negativen Zellwand.^[1]

eine dicke Peptidoglykanschicht. Die gram-negativen Bakterien sind hingegen nach der Anfärbung wieder entfärbbar und besitzen zusätzlich eine zweite Lipiddoppelmembran. Diese so genannte Lipopolysaccharidschicht (LPS) ist weitaus stärker als die cytosolische Membran asymmetrischer Natur und besteht innen aus Phospholipiden und außen aus Lipopolysacchariden (**Abb. 1.1 B, C**). Letztere Verbindungen sind aus verschiedensten Zuckern bestehende komplexe Moleküle, deren Fettsäuren über eine Esterbindung an *N*-Acetylglucosaminphosphat gebunden sind. Die äußere Membran (*Outer Membrane, OM*) der

gram-negativen Bakterien fungiert als eine Art Schutzschild gegenüber der Zellumgebung. Ihre Masse besteht zu 50% aus Proteinen, die entweder als integrale Membranproteine vorliegen oder als N-terminal verknüpfte Lipide in der Membran verankert sind. Die äußere Membran ist relativ durchlässig für kleine polare Moleküle, die durch die porenbildenden und wassergefüllten *Outer membrane proteins (Omp)* aufgenommen werden können. Diese Proteine nehmen zumeist eine β -Fass-artige Struktur ein, während das vorherrschende Strukturmotiv bei den Membranproteinen der inneren Membran die α -Helix ist.

Das Vorkommen von passiven oder aktiven Ionenkanälen und Transportproteinen in der inneren Membran ist lebensnotwendig für das Überleben einer Zelle, da die Kommunikation der Zelle mit der Umgebung über die Ionenkanäle geschieht. Sie sind verantwortlich für die Regulation des Zellvolumens, des intrazellulären pH-Wertes und der Ionenzusammensetzung. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Energiehaushalt der Zelle, bei der Muskelkontraktion, bei der Reizweiterleitung und vielen weiteren entscheidenden Prozessen. Verschiedene ernsthafte Krankheiten werden auf defekte Ionenkanäle zurückgeführt. Das Verständnis von Funktion und Struktur dieser bemerkenswerten Proteinklasse ist entscheidend, um wichtige Zellprozesse verstehen zu können und gegebenenfalls Fehlfunktionen zu korrigieren. So wurde in 1998 der Nobelpreis für Chemie an Walker, Skou und Boyer für die funktionelle Aufklärung der Na^+/K^+ -Pumpe verliehen^[2] und nur fünf Jahre später an MacKinnon für die strukturelle Aufklärung des K^+ -Kanals KcsA aus *Streptomyces lividans*^[3] (siehe auch Kapitel 1.2.1) und Agre für die Entdeckung der Aquaporine überreicht.^[4]

Die Proteine der äußeren Membran sind ebenfalls Gegenstand zahlreicher struktureller und funktioneller Charakterisierungen. Abhängig von Funktion und Struktur werden die *Omp* in fünf unterschiedliche Gruppen eingeteilt, welche in **Tab. 1.1** aufgelistet sind. (Eine übersichtliche und vollständige Liste ist unter http://blanco.biomol.uci.edu/membrane_proteins_xtal.html einsehbar). Neben dem Vorkommen in der äußeren Zellmembran kommen die β -Fass-artigen Proteine auch in der äußeren Membran von Mitochondrien (MOM) und Chloroplasten vor (siehe Kapitel 1.1.6).

Gruppe bzw. Name des Porins	Organismus	Zahl der β - Stränge	PDB-Code
Generelles Porin			
Rc-Porin	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	16	2POR
OmpF	<i>E. coli</i>	16	2OMF
OmpC	<i>E. coli</i>	16	2J1N

PhoE	<i>E. coli</i>	16	1PHO
Rb-Porin	<i>Rhodobacter blasticus</i>	16	1PRN
Pd-Porin	<i>Paracoccus denitrificans</i>	16	- [§]
OmpK36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	1OSM
Omp32	<i>Comamonas acidovorans</i>	16	1E54
Spezifisches Porin			
LamB	<i>E. coli</i>	18	1MAL
LamB	<i>Salmonella typhimurium</i>	18	1MPR
ScrY	<i>Salmonella typhimurium</i>	18	1OH2
Zusammengesetzte Pore			
Gramicidin A	<i>Bacillus brevis</i>	2	1MAG
α -Hämolysin	<i>Staphylococcus aureus</i>	14	7AHL
TolC	<i>E. coli</i>	12	1EK9
Transport-Omp			
FhuA	<i>E. coli</i>	22	1BY3
FepA	<i>E. coli</i>	22	1FEP
FecA	<i>E. coli</i>	22	1KMO
BtuB	<i>E. coli</i>	22	1NQH
EspP	<i>E. coli</i>	12	2QOM
OmpW	<i>E. coli</i>	8	2F1V
TodX	<i>Pseudomonas putida</i>	14	3BS0
TbuX	<i>Ralstonia pickettii</i>	14	3BRY
PapC	<i>E. coli</i>	24	2VQI
OmpG	<i>E. coli</i>	14	2IWV*/ 2IWW [#]
Porenloses Omp			
OmpA	<i>E. coli</i>	8	1QJP
OmpX	<i>E. coli</i>	8	1QJ8
OmpLA	<i>E. coli</i>	12	1QD5
OmpT	<i>E. coli</i>	10	1I78
OpcA	<i>Neisseria meningitidis</i>	10	1K24
NspA	<i>Neisseria meningitidis</i>	8	1P4T

[§] Struktur nicht hinterlegt | ^{*} entspricht einer offenen Konformation | [#] entspricht einer geschlossenen Konformation

Tabelle 1.1: Übersicht über strukturell charakterisierte äußere Membranproteine mit β -Fass-Struktur

Die Gruppe der generellen Porine ist die Größte der fünf Gruppen. Die ersten Kristalle dieser Membranproteingruppe, die eine Röntgenbeugung bis 3.3 Å zeigten, lieferte das Porin OmpF.^[5] Dies zeugt von der hohen intrinsischen Stabilität der Porine. Die spezifischen Porine sind den generellen Porinen strukturell sehr ähnlich, besitzen jedoch zwei weitere β -Stränge.^[6-8] Die Proteine beider Gruppen bilden in der biologisch aktiven Form ein homo-Trimer. Eine strukturell unterschiedliche Gruppe bilden die zusammengesetzten Porine, bei denen die Pore aus einem Homooligomer besteht. Dazu zählt z. B. das heptamere α -Hämolysin oder das dimere Gramacidin A. Hierbei nimmt die Polypeptidkette in den einzelnen Monomeren nicht die sonst vorliegende β -Faltblatt-Struktur ein.^[9] Die Gruppe der Porine mit einer Transportfunktion verfügt über einen deutlich größeren β -Fass-Durchmesser sowie weitere interne Domänen, die als Sperre fungieren.^[10] Sie bilden keine Pore aus, aber öffnen und schließen sich für die Passage größerer Moleküle wie Eisen-enthaltende Siderophore oder Cobalaminen durch die äußere Membran.

Die letzte Gruppe der äußeren Membranproteine bilden wahrscheinlich keine Poren in der biologisch aktiven Konformation aus, sondern sind vielmehr als eine Art Membrananker mit unterschiedlichen Funktionen zu verstehen.^[11]

In **Abb. 1.2** befindet sich eine Auswahl bereits veröffentlichter Strukturen der *Omp*.

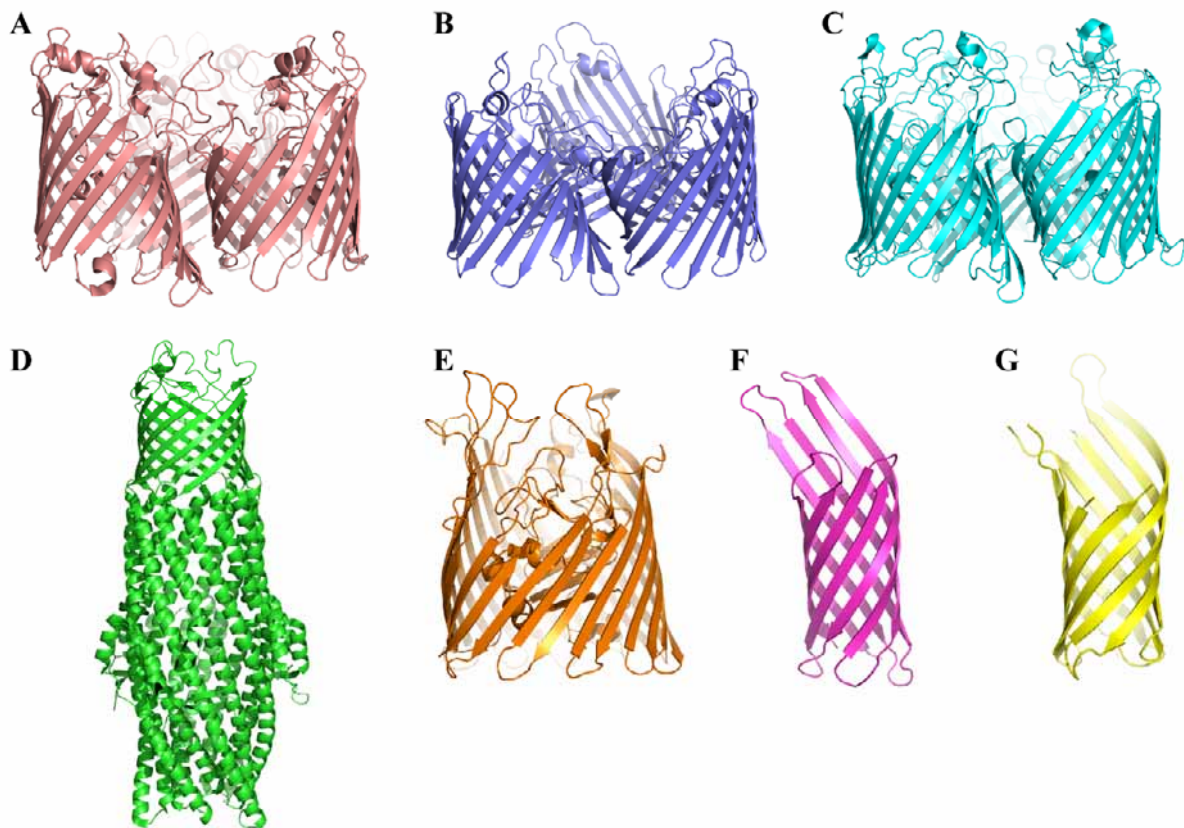


Abbildung 1.2: Beispielsstrukturen der OM-Proteine aller fünf Klassen. Für die PDB-Codes siehe **Tab. 1.1**. (A) OmpC^[12] (B) Rb-Porin^[13] (C) LamB^[6] (D) Homo-trimeres TolC mit 100 Å langer α -helikaler Domäne, die einen Tunnel ausbildet.^[14] (E) BtuB^[15] (F) OmpX^[16] (G) OmpA^[17].

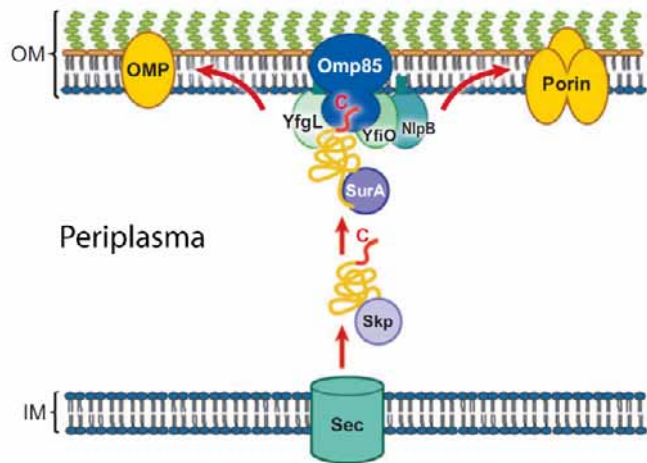
1.1.1. Biogenese der äußeren Membranproteine gram-negativer Bakterien

Während die Struktur, Zusammensetzung und Funktion der äußeren Membran bereits seit längerem bekannt ist, ist ihre Biogenese lange Zeit rätselhaft geblieben. Neben den äußeren Membranproteinen besteht die Membran aus Phospholipiden, Lipopolysacchariden und Lipoproteinen, zu deren Synthese, Transport und Einbau mittlerweile vieles bekannt ist.^[18] Der Fokus dieses Kapitels ist im Wesentlichen auf den Transport und den Einbau der *Omp* gerichtet.

Alle Komponenten für die OM werden im Cytoplasma synthetisiert. Im Anschluss daran müssen diese durch die innere Membran und das Periplasma geschleust werden, um schließlich in die Membran eingebaut zu werden (**Abb. 1.3**). Die integralen Membranproteine sind mit einer N-terminalen Signalsequenz versehen, die für die Translokation benötigt wird. Zwei Translokationssysteme sind bisher bekannt, die sich in der *Inner Membrane* (IM) befinden: das Sec-System befördert ungefaltete Proteine,^[19] während das Tat-System bereits im Cytoplasma gefaltete Proteine transportiert.^[20] Alle bisher bekannten *Omp* werden durch das Sec-System befördert und im Periplasma unter Mithilfe der beiden Chaperone Skp und

SurA stabilisiert bzw. gefaltet.^[21, 22] Skp verhindert eine Aggregation der Proteine, und SurA erkennt selektiv die *Omp* an einem aromatischen Motiv (typischerweise Ar-Ar oder Ar-X-Ar).^[23]

Abbildung 1.3: Modell für die Omp-Biogenese. Das ungefaltete *Omp* wird mittels Sec-Transporter durch die innere Membran geschleust und durch die Chaperone Skp und SurA stabilisiert bzw. gefaltet. Der multi-Enzymkomplex um Omp85 sorgt für die korrekte Faltung und Insertion in die äußere Membran.^[18]



Weitere Enzyme sind höchst wahrscheinlich an der Faltung der *Omp* beteiligt. DsbA und DsbC sind für die Ausbildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken verantwortlich, wie am Beispiel einer Cystein-Mutante von PhoE gezeigt.^[21] DegP ist eine Protease und baut un- oder falschgefaltete Proteine ab, zeigte aber *in vitro* ebenfalls Chaperon-Aktivität.^[24] Zellen mit einer Kombination aus *surA* und *degP*-Mutationen starben hingegen.^[25]

Eine zentrale Komponente der Omp-Einbau-Maschinerie wird durch das Protein Omp85 gebildet.^[26] Es übernimmt eine essentielle Rolle für das Überleben der Bakterien.^[27] Homologe Gensequenzen von *omp85* wurden in allen verfügbaren Genomen von gram-negativen Bakterien gefunden.^[28] Zusätzlich wird es durch die Gensequenzen für die Chaperone Skp und RseP (ehemals YaeL) flankiert. Letztere codiert eine Protease, die in die σ^E -abhängige Stressantwort von *E. coli* eingebunden ist und durch Akkumulation von *Omp* im periplasmatischen Raum aktiviert wird. SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass Omp85 Teil eines hochmolekularen Komplexes ist, der sich zusätzlich aus den Proteinen YfgL, YfiO und NlpB bildet, wobei der Komplex aus je einem Monomer besteht.^[26, 29] Aufgrund eines Topologiemodells wurde vermutet, dass Omp85 aus einer β -Fass-Domäne und einer periplasmatischen löslichen Domäne besteht, was durch proteolytische Experimente untermauert wurde.^[26, 30, 31] Die periplasmatische Domäne verfügt über eine konservierte POTRA-Domäne (*polypeptide transport associated*), der eine Chaperon-ähnliche Eigenschaft zugeschrieben wird.^[32] In künstliche Lipidmembranen rekonstituiertes Protein erlaubte die Untersuchung dieses ionenleitenden Proteins, wodurch die Interaktionen mit verschiedenen *Omp* studiert und eine C-terminale Erkennungssequenz entdeckt werden konnte, bei dem das C-terminale Phe eine zentrale Rolle einnimmt.^[31, 33] Mutationen dieser Sequenz am Beispiel

von OmpA zeigten, dass ein alternativer Aufbauweg existiert, der jedoch eine verlangsamte Kinetik aufweist.^[34] Daher wird vermutet, dass Omp85 in der Lage ist, interne β -Stränge zu erkennen, falls die Erkennungssequenz „defekt“ ist. Ebenso wurde die Abhängigkeit der Omp-Biogenese von LPS-Molekülen untersucht. So konnte z. B. PhoE u. a. in Anwesenheit von LPS-Molekülen zurückgefaltet werden.^[35] Weiterhin zeigt das Chaperon Skp eine LPS-Abhängigkeit. In der Kristallstruktur dieses Proteins aus *E. coli* (PDB-Code: 1U2M) wurde eine mögliche LPS-Bindungsstelle gefunden.^[36] Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen waren Mutanten, bei denen die LPS-Biosynthese unterbunden war, vital und wiesen eine korrekte Faltung der *Omp* auf,^[37] sodass die Rolle der LPS-Moleküle in diesem Zusammenhang nicht vollständig geklärt ist.

1.1.2. Regulation der Gen-Expression der Porine

Die Signaltransduktion in Bakterien besteht meist aus einem Zweikomponentensystem. Die erste Komponente ist eine Sensorkinase, oft ein Membranprotein, das durch ATP an einem konservierten Histidin phosphoryliert ist. Die Kinase nimmt ein Signal aus der Umgebung auf und überträgt die Phosphatgruppe auf einen konservierten Aspartat-Rest des Antwortregulators, der die zweite Komponente darstellt. Der Antwortregulator ist häufig ein Zwei-Domänen-Enzym und besteht aus einer Empfangsdomäne, die die Antwort über eine Effektor-Domäne weitergibt, wobei es sich oft um DNA-Bindung handelt. Im Falle der beiden Porine OmpF und OmpC regelt ein gut untersuchtes System, bestehend aus der Sensorkinase EnvZ und dem Antwortregulator OmpR, die Genexpression.

Die Häufigkeit der Porine in der Membran ist von einer Vielzahl von Umweltbedingungen abhängig, wie z. B. Osmolarität, Temperatur, pH und Wachstumsphase, und muss den aktuellen Bedingungen schnell und flexibel angepasst werden. Die Summe des Vorkommens von OmpF und OmpC ist konstant, die prozentuale Verteilung hängt jedoch von der Osmolarität der

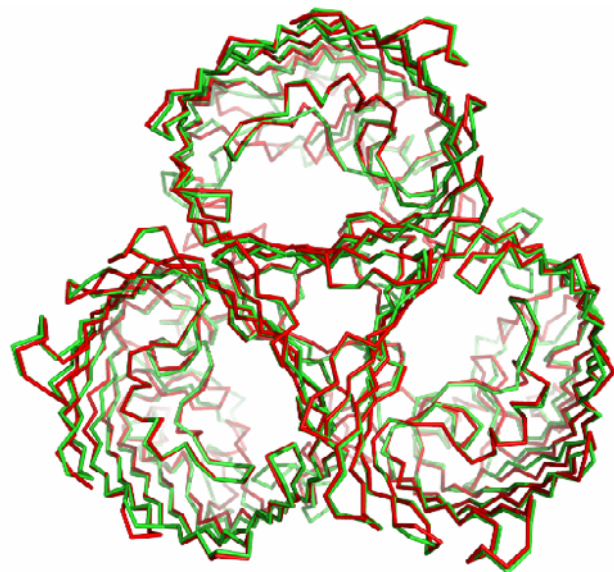
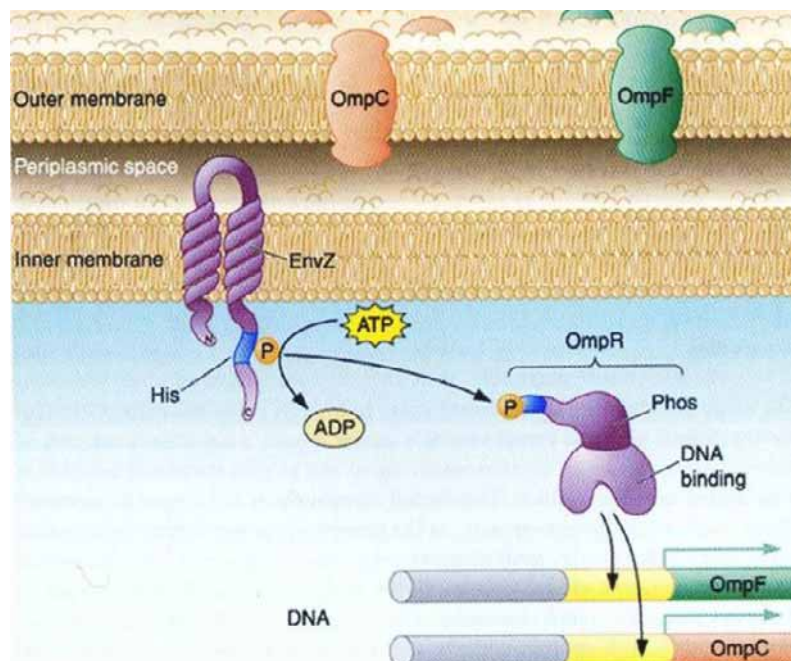


Abbildung 1.4: Vergleich der beiden trimeren generellen Porine OmpF (grün) und OmpC (rot). Verwendete PDB-Codes: 1OPF bzw. 2J1N.

Zellumgebung ab. Bei niedriger Osmolarität ist OmpF dominierend, während bei hoher Osmolarität der Anteil an OmpC überwiegt.^[38] Beide Porine haben die gleiche trimere Architektur und rund 74% der Aminosäuren von OmpC sind gegenüber OmpF konserviert. Ursprünglich wurde als Erklärung für die Bevorzugung von OmpC bei hoher Osmolarität der kleinere Porendurchmesser als Erklärung herangezogen,^[39] jedoch zeigte der Vergleich beider Röntgenstrukturen eine sehr ähnliche trimere Architektur mit vergleichbaren Porengrößen (Abb. 1.4).^[12] Höchst wahrscheinlich ist ein unterschiedliches elektrostatisches Porenpotential für den Effekt verantwortlich.

EnvZ ist in der inneren Membran lokalisiert und besteht aus zwei transmembranen Domänen. Am C-Terminus befindet sich eine katalytische Kinase/Phosphatase-Domäne. Ein bisher noch unbekanntes Signal leitet die Phosphorylierung von Aminosäure His243 durch ATP ein, und anschließend wird der Phosphatrest auf OmpR-Asp55 transferiert (Abb. 1.5). Daraufhin ändert sich die Affinität von OmpR für regulatorische DNA-Elemente stromaufwärts der *ompF*- und *ompC*-Gene, und das Level der Genexpression ändert sich zugunsten von OmpC.^[40] Durch die Phosphatase-Aktivität von EnvZ wird der Phosphatrest wieder von OmpR abgespalten und die Expression passt sich der Osmolarität der Zellumgebung wieder an.

Abbildung 1.5: Regulation der Genexpression durch die Sensorkinase EnvZ und den Antwortregulator OmpR. OmpF ist bei niedriger Osmolarität vorherrschend, bei hoher Osmolarität wird *ompF* reprimiert und OmpC hingegen ist dominierend.^[41]



Zusätzlich existieren in der Zelle weitere regulatorische Proteine, wie z. B. MicF. Die mRNA des stromaufwärts zu *ompC* gelegenen Gens *micF* interferiert mit der *ompF*-Translation. Dieses Gen wird bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C oder höher, beim Erreichen der

stationären Phase oder durch Anwesenheit von toxischen Substanzen positiv reguliert, sodass die Anzahl der OmpF-Poren in der Membran reduziert wird.^[42]

1.1.3. Funktionen der *Outer membrane proteins*

Die Funktionspalette der Porine ist äußerst vielfältig. Da sie in der äußeren Membran lokalisiert sind, stellen sie das „Tor“ zwischen extrazellulärem Medium und der Zelle dar. Sie können als Eintrittsluken angesehen werden, die mehr oder weniger selektiv Moleküle für die Aufrechterhaltung wichtiger Zellfunktionen passieren lassen oder transportieren. Abhängig von der jeweiligen Spezies und den Umweltbedingungen können die Porine mit 10^4 - 10^6 Kopien pro Zelle vorliegen.^[43] Um bei einer solch hohen Zahl von hydrophilen Kanälen die Aufnahme von schädlichen Verbindungen zu verhindern, müssen die Bakterien die Stärke der Expression unter den gegebenen externen Bedingungen sorgsam regulieren (siehe vorangestelltes Kapitel). Die Porine spielen eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegenüber verschiedener Antibiotika^[44, 45] und sind daher Gegenstand vieler klinischer Studien. Durch die Kontrolle der Gen-Expression, die Wahl des entsprechenden Porins und die alternative Produktion eines mutierten Porins mit veränderter Kanalaktivität sind die Bakterien in der Lage, auf einen für sie tödlichen Wirkstoff zu reagieren.

Die generellen Porine sind im Wesentlichen als Diffusionsporen anzusehen, durch die kleinere Moleküle und Ionen in das Periplasma gelangen können. Das Substrat-spezifische Maltoporin LamB aus *Salmonella typhimurium* oder *E. coli* transportiert passiv Maltodextrine. Beide homologe Proteine weisen eine hohe Sequenzvariabilität auf, sind aber strukturell sehr ähnlich und weisen einen r.m.s.d-Wert von nur 0.5 Å auf.^[6, 7] Die Gruppe der zusammengesetzten Poren besitzen höchst unterschiedliche Topologien. So weist das bakterielle Toxin α -Hämolysin (α -HL) eine Pore auf, die aus sieben Monomeren besteht, Gramicidin A besteht lediglich aus zwei Monomeren. Durch seinen großen Porendurchmesser von 14 Å lässt α -HL Moleküle bis zu einer Größe von 2 kDa passieren. Das Porin entfaltet seine toxische Wirkung, indem es sich nach Sekretion in die Membran des Wirtes einlagert und dadurch die Lyse von roten Blutkörperchen verursacht. Das erstmals aus *Bacillus brevis* isolierte Gramicidin, das aus den Subtypen A, B und C besteht, entfaltet *in vivo* eine bakterizide Wirkung, indem es die Permeabilität der Zellwand erhöht und somit das Konzentrationsgefälle entlang der Membran zerstört wird.

Viele der Porine, die in den Transport von organometallischen Kofaktoren wie z. B. der Cobalamintransporter BtuB aus *E. coli* eingebunden sind, sind an ein weiteres Protein namens

TonB gekoppelt.^[15] Dieses Protein ist Teil eines Komplexes, der an die innere Membran gebunden ist und die protonenmotorische Kraft ausnutzt, um den aktiven Transport zu bewerkstelligen. Weitere Röntgenstrukturen von TonB-abhängigen Eisen-Transportern wie FepA, FhuA und FecA wurden ebenfalls gelöst.^[10, 46-48] Das monomere OmpG ist in die Aufnahme von Oligosacchariden involviert und zeigt ein pH-abhängiges Öffnen und Schließen der Pore (**Abb. 1.6**). Die extrazelluläre Schleife L6 faltet sich nach Protonierung von His-Resten durch Abstoßung der positiven Ladungen in die Pore und verschliesst den Kanal, wahrscheinlich um eine zu hohe Azidität im Periplasma zu verhindern.^[49]

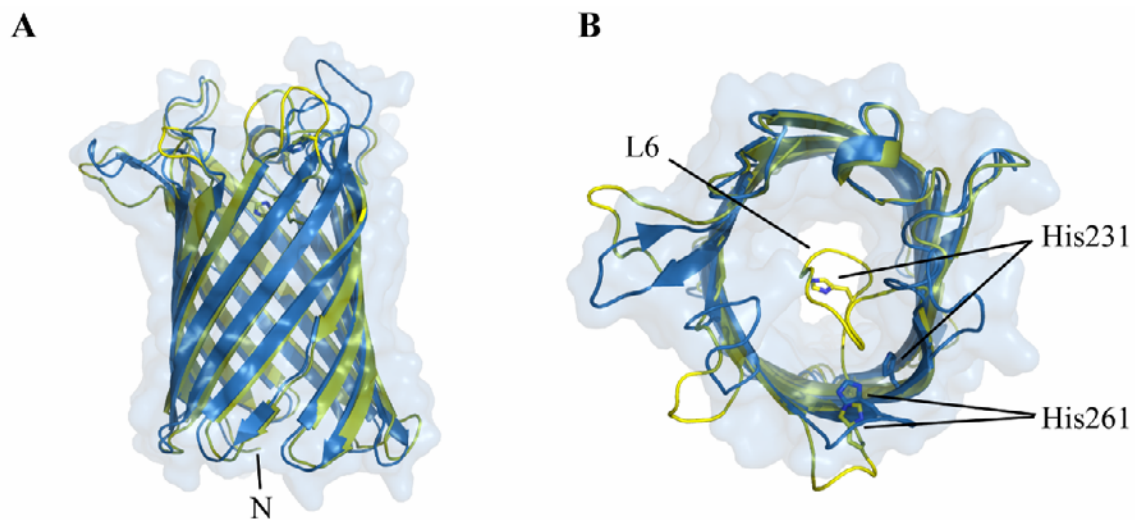


Abbildung 1.6: Die dreidimensionale Struktur von OmpG als Überlagerung der offenen (PDB-Code: 2IWW, blau) und geschlossenen (PDB-Code: 2IWW, gelb) Struktur mit transparenter Oberflächendarstellung der offenen Pore. (A) Seitenansicht auf das 14-strängige β -Fass, der C-Terminus liegt auf der Rückseite. (B) Aufsicht auf die Pore, die Schleife L6 faltet in die Pore und verhindert den Durchtritt von Ionen bei einem pH-Wert < 6 . Der Abstand zwischen den Zentren der Imidazolringe der His-Reste vergrößert sich von 4.9 Å auf 13.7 Å.

Die letzte Gruppe der äußeren Membranproteine nutzt die β -Fass-Struktur als Anker in der Membran. Der membrandurchspannende Teil des Porins OmpA besteht aus acht β -Strängen und besitzt einen Durchmesser von 26 Å. Es kommt häufig in der Membran vor und stabilisiert diese.^[50] OmpA fungiert als ein Rezeptor für Bakteriophagen^[51] und vermittelt so Virulenz und Pathogenität.^[52, 53]

OmpT gehört zu der Gruppe der Omptin-Proteasen, die in der äußeren Membran einiger gram-negativer Bakterien vorkommen.^[54] Zu ihnen zählen als Beispiele PgtE aus *Salmonella typhimurium*,^[55] SopA aus *Shigella flexneri*^[56] und OmpP aus *E. coli*.^[57] Verschiedene Studien haben die Pathogenität der Bakterien auf ein Mitwirken der Omptin-Proteine zurückgeführt. So wurde in klinischen Isolaten von *E. coli* OmpT in Verbindung mit

Harnwegsinfekten gebracht.^[58] Die Protease zeigt unter alkalische Bedingungen eine maximale Aktivität. Sie ist abhängig von Lipopolysacchariden (LPS) und spaltet ihre Substrate zwischen zwei aufeinander folgenden basischen Aminosäuren,^[59] selbst unter extrem denaturierenden Bedingungen wie 8 M Harnstoff.^[60] Das zehn Stränge umfassende β -Fass hat eine Länge von 70 Å, von dem ein 40 Å langer Bereich aus der Membran in den extrazellulären Raum knapp über die LPS-Moleküle hineinragt (**Abb. 1.7**). Aus strukturellen Vergleichen mit FhuA^[48] wurde eine LPS-Bindungsstelle in OmpT abgeleitet, da drei von vier an der LPS-Bindung beteiligten Aminosäuren konserviert sind. Die vorgeschlagene katalytische Stelle der Protease liegt im extrazellulären Bereich in einer großen und negativ geladenen Rinne. Mutationen zu unpolaren Aminosäuren wie Alanin führten zu einer reduzierten Aktivität.^[59]

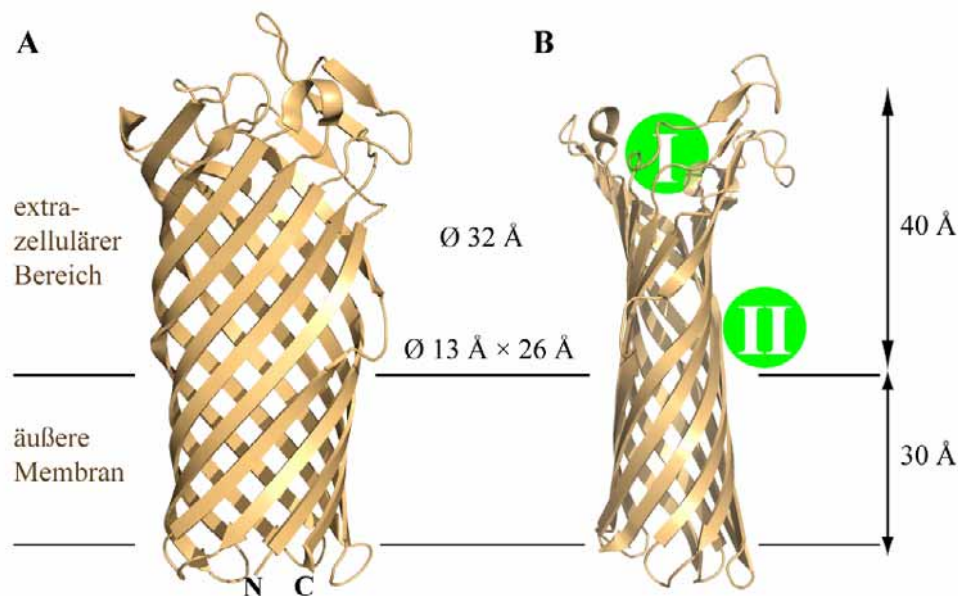


Abbildung 1.7: Seitenansichten von OmpT (PDB-Code: 2I78) mit Andeutung der äußeren Membran und Angabe des (zirkulären) Durchmessers. Der grüne Kreis I markiert die Bindungstasche; II markiert die LPS-Bindungsstelle. Die Ansichten von (A) und (B) sind um 90° gedreht.

1.1.4. Allgemeiner Aufbau der β -Fass-artigen Porine

Die β -Fass-Struktur der äußeren Membranproteine weist die folgenden sechs gemeinsamen Konstruktionsprinzipien auf:^[61, 62]

- (i) Das N- bzw. C-terminalen Ende befindet sich auf der dem Periplasma zugewandten Seite.
- (ii) Der Verkipfungswinkel α variiert zwischen 30° und 60°. Von außen betrachtet ist die Verkipfung rechts-gerichtet und sorgt für eine chirale Anordnung der β -Fässer.

- (iii) Die β -Stränge sind mit ihren direkten Nachbarsträngen verbunden, sodass ein antiparalleles β -Faltblatt entsteht. Von der Außenseite betrachtet läuft die Polypeptidkette von rechts nach links.
- (iv) Auf der periplasmatischen Seite sind die β -Stränge über kurze Schleifen (*turns*) miteinander verbunden; auf der extrazellulären Seite sind sie über längere Schleifen (*loops*) miteinander verbunden.
- (v) Die externen Schleifen weisen eine hohe Sequenzvariation auf und sind flexibel.
- (vi) Die an die Membran grenzende Oberfläche besitzt ein 20 Å großes Band aliphatischer Aminosäuren, das auf beiden Seiten durch einen oberen und unteren Gürtel aromatischer Aminosäuren abgeschildert ist.

Als weitere Parameter zur Beschreibung eines β -Fasses wird die Zahl der β -Stränge n , der Radius r , die Scherenzahl S (*shear number*) und der Verkipfungswinkel α (*tilt angle*) angegeben. **Abb. 1.8** illustriert die einzelnen Parameter.

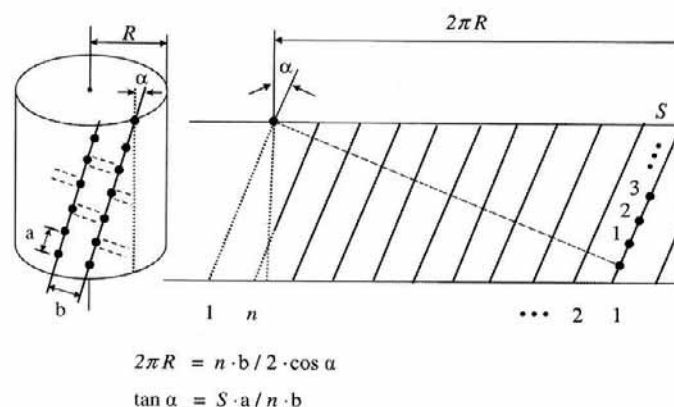


Abbildung 1.8: Generelles Konstruktionsprinzip der β -Fässer.^[61] Die Scherenzahl S ist definiert als die Zahl der Aminosäuren, die bei einer Umdrehung um das Fass entlang der H-Brücken gezählt werden. α ist annähernd konstant. Der Radius R hängt von a oder S und n ab. Die Peptidparameter lauten: $a = 3.3$ Å; $b = 4.4$ Å.

1.1.5. Der Aufbau des generellen Porins OmpF

Die generellen Porine stellen die häufigste Spezies der äußeren Membranproteine dar. Es sind mittlerweile mehr als zehn Röntgenstrukturen bekannt. Alle verfügen über ein β -Fass bestehend aus 16 β -Strängen mit einer trimeren Architektur. Die Struktur des trimeren OmpF (**Abb. 1.9 A**) aus *E. coli* wurde 1992 von Cowan *et al.* publiziert,^[63] bereits in 1980 wurden erste Kristalle von OmpF beobachtet.^[5]

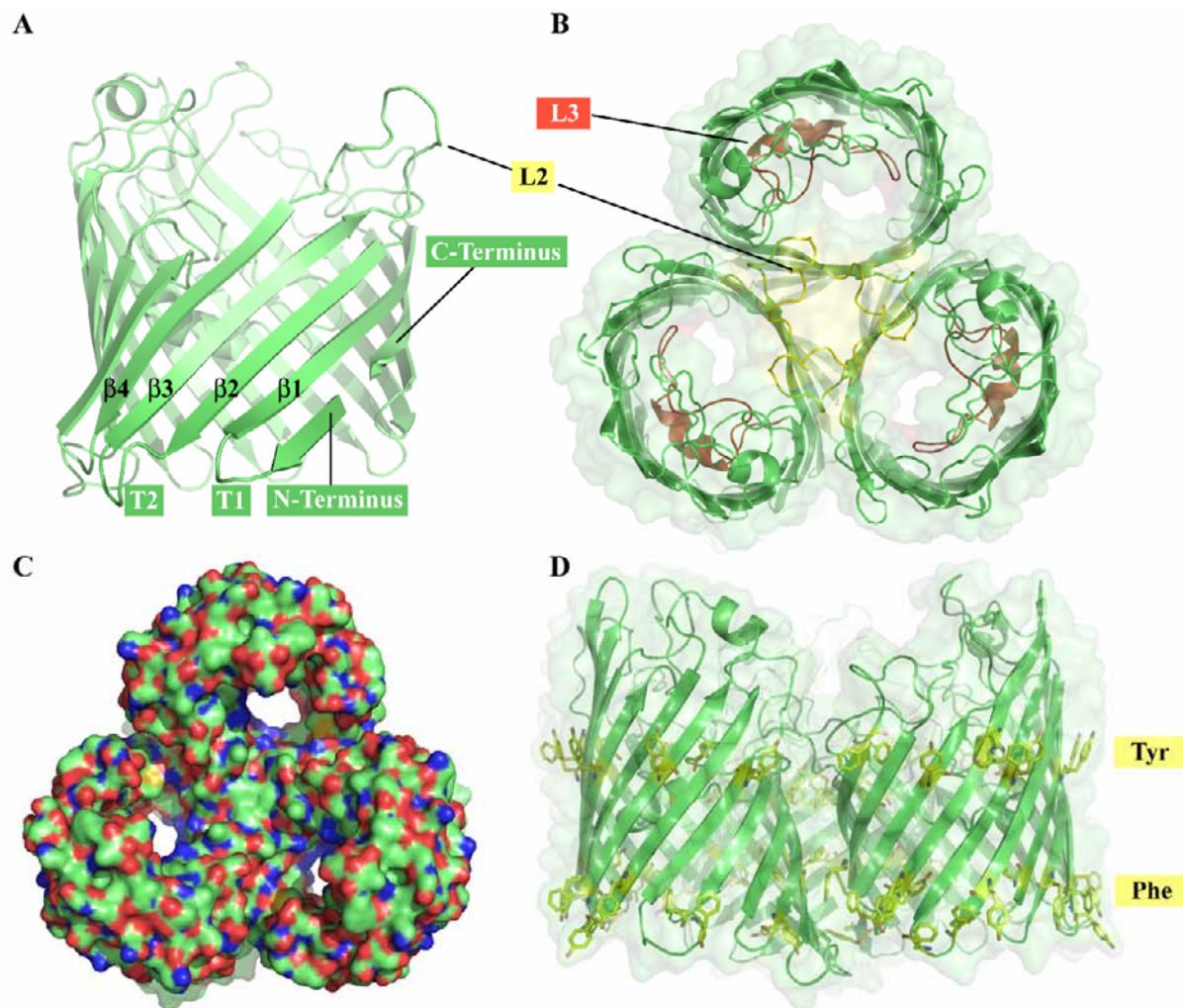


Abbildung 1.9: Ansichten auf das bakterielle Porin OmpF. (A) Seitenansicht auf das Monomer. (B) Aufsicht auf das Trimer mit transparenter Oberflächendarstellung und mit den hervorgehobenen Schleifen L2 (gelb) und L3 (rot). (C) Aufsicht auf das Trimer. (D) Seitenansicht auf OmpF mit den beiden aromatischen Gürteln.

Die zentrale Fass-Achse ist nicht wie meist üblich senkrecht zur Membran ausgerichtet, sondern nimmt eine Verkipfung von 10° ein. OmpF hat eine Scherenzahl von 20, einen Verkipfungswinkel von 45° und einen Radius von 15.5 \AA . OmpF besteht exklusive seiner 22 Aminosäuren langen Signalsequenz, die als Zielangabe des Proteins zu verstehen ist, aus 340 Aminosäuren. Jedes Monomer besitzt von der Seite betrachtet eine asymmetrische Form. Die der Membran zugewandten Höhe beträgt 35 \AA , und die Höhe an der Trimer-Grenzfläche 28 \AA . Auf der extrazellulären Seite werden die einzelnen β -Stränge durch Schleifen miteinander verknüpft, von denen den Schleifen L2 und L3 eine besondere Bedeutung zukommt: L2 sorgt für eine Verknüpfung der einzelnen Monomere, und L3 faltet sich in das Innere der Pore, bildet dort eine kurze α -Helix aus und sorgt somit für eine ellipsoide Verengung auf $7 \times 11 \text{ \AA}$, die den Durchtritt von kleinen Molekülen und Ionen bis 600 Da erlaubt (Abb. 1.9 B, C).^[63] Die terminalen Enden des Monomers sind über eine Salzbrücke

miteinander verbunden und liegen an der Seite der Grenzfläche. Die beiden Ringe der aromatischen Aminosäuren Tyr und Phe liegen etwa 19 Å auseinander und etwa 6 Å von den Porenenden entfernt (**Abb. 1.9 D**). Zwischen ihnen befinden sich nicht-polare Aminosäuren wie Leu und Val, die für die hydrophobe Interaktion zwischend den Monomeren und der Membran verantwortlich sind. Die Polarität der aromatischen Seitenketten ist ideal geeignet, um den Bereich der Estergruppen zwischen den polaren Kopfgruppen und dem hydrophoben Teil der Fettsäuren abzudecken. Die C_{α} - C_{β} -Bindung zeigt radial nach außen, sodass der Aromat frei drehbar ist. Es zeigte sich, dass die beiden Gürtel als Stabilisatoren der Porine in der Membran angesehen werden können. Diese Stabilisierung ist notwendig, da die Membran durch mechanischen Stress z. T. starken Fluktuationen ausgesetzt ist und so die Integrität gewährleistet wird (**Abb. 1.10 A**).^[64]

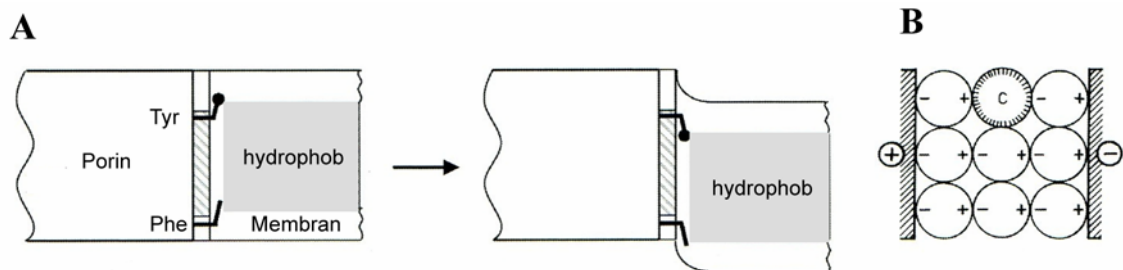


Abbildung 1.10: (A) Schema der Porin/Membran-Grenzfläche in einer üblichen (links) und versetzten (rechts) Anordnung mit den beiden aromatischen Gürteln. (B) Schema des transversalen elektrischen Feldes innerhalb der Pore mit den geladenen Seiten und den ausgerichteten Wasser-Molekülen.^[65]

Der dem extrazellulären Medium zugewandten Bereich oberhalb des zweiten Gürtels besteht aus ionogenen Aminosäuren (Asp und Glu), die für eine Interaktion mit der Lipopolysaccharid-Schicht verantwortlich sind. Die Grenzfläche zwischen den einzelnen Monomeren wird aus hydrophoben Aminosäuren gebildet und füllt die zentrale Achse vollständig aus. Es wurde vorgeschlagen, dass das Porin an der zentralen Achse beginnend im Periplasma assoziiert und dann in die Membran eingelagert wird, sodass die Termini zunächst fixiert werden und dadurch der Zusammenbau deutlich erleichtert wird.^[64]

Innerhalb der Pore kommt es durch die polaren Aminosäuren Arg42/Arg82/Arg132 und Asp113/Glu117 zur Bildung eines transversalen elektrischen Feldes, in dem die Wassermoleküle aufgrund ihres Dipols ausgerichtet sind (**Abb. 1.10 B**). Das behindert den passiven Durchtritt für hydrophobe Moleküle und verstärkt ihn für polare Moleküle, die in einer geordneten eindimensionalen Diffusion den Kanal passieren können.

1.1.6. Eine Ausnahme: Der spannungsabhängige Anionen-Kanal (VDAC) der äußeren Mitochondrienmembran

Alle eukaryotischen Zellen benötigen einen Austausch von Metaboliten zwischen Cytoplasma und Mitochondrien. Die äußere Membran der Mitochondrien enthält drei Familien integraler Membranproteine, von denen zwei Teil eines größeren Proteinkomplexes sind. Hierbei handelt es sich um die Import-Pore TOM (*translocase of the outer membrane*) und die Insertase SAM (*sorting and assembly machinery*), die für die gesamte Translokation und Insertion fast aller neu synthetisierten Proteine mit Ziel Mitochondrien verantwortlich sind.^[66, 67] Zur dritten Familie zählt der in 1976 entdeckte spannungsabhängige Anionenkanal VDAC (*voltage-dependent anion channel*),^[68] der in hoher Zahl in der Membran vorliegt. Dieser kann neben einer Spannungsänderung von ± 30 mV auch durch Proteininteraktionen und Modulatoren wie z. B. NADH geschlossen werden. Eine der drei existierenden Isoformen, VDAC-1, steht im Verdacht, aufgrund von apoptotischen Signalen einen mitochondrialen Ausgang für Moleküle zu bilden. Durch diesen würden Proteine ausgeschleust, die durch verschiedene Mechanismen den Zelltod einleiten.^[69]

Im Jahr 2008 wurde von drei verschiedenen Gruppen die Struktur von VDAC-1 publiziert: die durch NMR gelöste Struktur des humanen Proteins,^[70] die Röntgenkristallstruktur des Kanals aus Maus,^[71] und durch die Kombination beider Methoden die Struktur des humanen Proteins.^[72] Auf Grundlage der strukturellen Daten dieses Kanals werden wichtige Implikationen für die Entwicklung neuartiger Therapeutika erwartet, um die Zellfunktionen im Krankheitsfall zu kontrollieren.^[73]

Das rekombinant erzeugte Protein wurde in allen drei Fällen in LDAO-Micellen zurückgefaltet und weist einige Besonderheiten auf. Der Ionenkanal besteht aus einem antiparallelen β -Fass, welches aus 19 β -Strängen besteht. Bisher war in allen 32 veröffentlichten prokaryotischen β -Fass-Strukturen nur eine gerade Anzahl von β -Strängen bekannt (Abb. 1.11). Daher kommen β -Strang Nr. 1 und 19 in einer parallelen Anordnung zum Liegen (Abb. 1.12 A). Das Protein bildet eine N-terminale α -Helix, die in

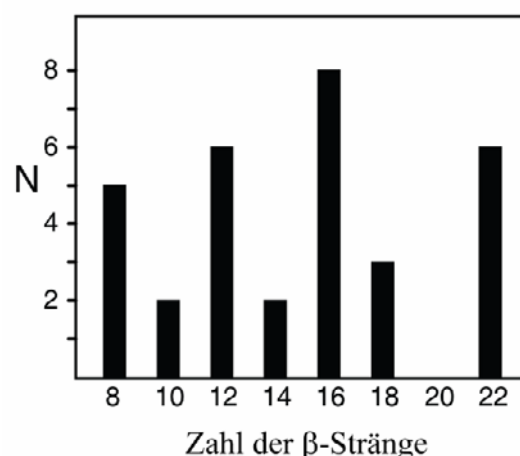


Abbildung 1.11: Histogramm für die Zahl der β -Stränge von bekannten β -Fass-Proteinen. (Stand: April 2008)^[70]

Höhe der Kanalmitte liegt und den Durchmesser des Kanals von $27 \times 24 \text{ \AA}^2$ auf $27 \times 14 \text{ \AA}^2$

verringert (**Abb. 1.12 B**). Diese Größe erlaubt noch den Durchtritt von Metaboliten, sodass in allen drei Fällen auf eine offene Konformation geschlossen werden kann. Die α -Helix stellt den spannungsabhängigen Schalter des Kanals dar. Sie besteht aus 26 Aminosäuren und bildet ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen mit der inneren Porenwand aus (**Abb. 1.12 C**). Verschiedenen Untersuchungen zufolge kann VDAC-1 unterschiedliche oligomere Zustände einnehmen,^[74-76] von denen eine durch hydrophobe Interaktionen der β -Stränge 1, 2, 18 und 19 vermittelte dimere Assoziierung in LDAO-Micellen gefunden wurde.

Durch Wasserstoff/Deuterium-Austauschreaktionen wurde eine höhere Instabilität der β -Stränge 1-4, verglichen mit den übrigen β -Strängen, beobachtet, die folglich verschiedene Konformationen einnehmen können. Hierbei werden Wasserstoffbrücken übergangsweise gelöst. Die strukturelle Integrität wird maßgeblich durch den streng konservierten Rest Glu73 beeinflusst. Mutationen an dieser Stelle führten zu einer erhöhten Stabilität sowie zu einer Funktionsänderung des Kanals, sodass VDAC-1 gegen Apoptose geschützt war.^[72]

Der Schließmechanismus des Kanals konnte bis dato noch nicht bewiesen werden, aber es wird vermutet, dass die α -Helix hierbei entscheidend ist, da sie über ein Scharnier in den Kanal hinein klappen könnte (**Abb. 1.12 D**).^[71] In Übereinstimmung mit dieser Theorie wurde gefunden, dass die Bindung von NADH den geschlossenen Zustand hervorruft.^[77] Die Bindungsstelle für dieses Dinukleotid wurde durch NMR-Experimente an den β -Strängen 17 und 18 lokalisiert und beruht auf Seitenkettenwechselwirkungen mit hydrophoben Resten des Kanals.^[70] Eine Bindung von NADH würde für eine Konformationsänderung sorgen und somit den Kanal verschließen.

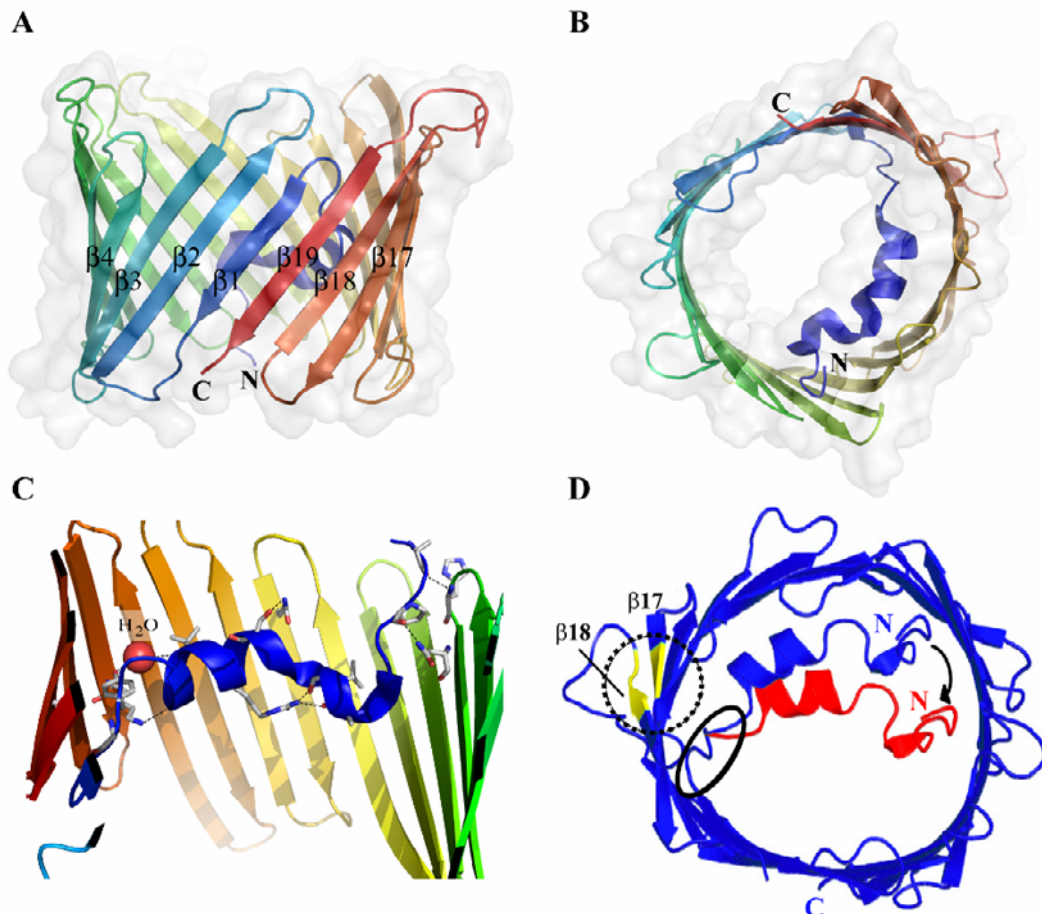


Abbildung 1.12: Der spannungsabhängige Anionenkanal aus der äußeren Mitochondrienmembran. **(A)** Seitenansicht auf das 19-strängige β -Fass mit paralleler Anordnung der β -Stränge 1 und 19. **(B)** Aufsicht auf den Ionenkanal in offener Konformation. Die N-terminale α -Helix verkleinert den Durchmesser auf $27 \times 14 \text{ \AA}^2$. **(C)** Die α -Helix bildet den löslichen Teil des Kanals und wird durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der Porenwand stabilisiert. **(D)** Vorgeschlagener Schließmechanismus, bei der durch eine NADH-Bindung an dem gelb markierten Bereich eine Konformationsänderung hervorgerufen wird. Die α -Helix wurde um 10° an dem Scharnier (schwarzer Kreis) rotiert.

1.2. Protein engineering und chemisch modifizierte Ionenkanäle

Bei der Entwicklung und Verbesserung von Ionenkanälen werden prinzipiell zwei unterschiedliche Strategien angewendet: zum einen kann auf der Basis eines strukturell bekannten und charakterisierten Proteins ein *re-design* durchgeführt werden, zum anderen können Kanäle in einem *de novo* Ansatz von Grund auf neu geplant und synthetisiert werden.^[78] Die beiden häufigsten Topologien von Membranproteinen sind β -Fass und α -Helices, die sich aufgrund der energetischen Anforderungen an Wasserstoffbrückenbindungen im Inneren der hydrophoben Membran bevorzugt ausbilden. Beide Typen eignen sich besonders gut für *protein engineering*. Während die β -Fass-Struktur bevorzugt für das *re-design* eingesetzt wird, kommen α -Helices eher für das *de novo* Design

in Frage. Hierfür können mehrere Gründe herangezogen werden. Für einen gänzlich neuen Kanal müssen Rückfaltungsbedingungen etabliert werden. Hierfür eignet sich ein α -helikales Protein in der Regel besser als ein β -Fass-Kanal. Für beide Proteintypen wurden Rückfaltungsbedingungen berichtet, durch die auch funktionelles Protein erhalten werden konnte.^[79, 80] Von den β -Fass-artigen Proteinen wurden im Gegensatz zu den α -helikalen Proteinen jedoch auch verschiedene Beispiele strukturell charakterisiert.^[49, 59]

Ein weiterer Vorteil der α -helikalen Proteine ist, dass sich die einzelnen Helices relativ zueinander in der Membran neu ausrichten können, sodass sich die biologisch aktive Konformation ausbildet. Generell ist bekannt, dass die Geschwindigkeit der Rückfaltung bei β -Fass eher langsam vonstatten geht, wie am Beispiel von OmpA untersucht wurde.^[80]

Beim *re-design* werden einzelne Aminosäuren u. a. gegen nicht-natürliche Aminosäuren ausgetauscht, um neue Funktionalitäten in das Protein einzuführen. Der Austausch einer einzigen Aminosäure kann die Funktionalität und den Aufbau eines α -helikalen Proteins aufgrund der zahlreichen Seitenketten/Seitenketten-Wechselwirkungen stark beeinträchtigen. In einem β -Fass hingegen sind die Wechselwirkungen der Seitenketten weniger existenziell, was diesen Proteintypus für das *re-design* prädestiniert.

In den folgenden Kapiteln werden Beispiele für beide Arten des *protein engineering*s gegeben.^[78, 81, 82]

1.2.1. Beispiele für das *re-design* von Ionenkanälen

Es gibt eine Vielzahl von Beispielen, in denen strukturell charakterisierte Ionenkanäle und Poren verwendet wurden, um deren Eigenschaften zu verändern und/oder zu verbessern.^[81] Hierzu zählen z. B. die Beeinflussung von Ionenspezifitäten, die Detektion von Ionen und Molekülen und eine licht- oder pH-gesteuerte Aktivität des Kanals. Im Folgenden werden verschiedene Beispiel exemplarisch erläutert.

Der K^+ -Ionenkanal KcsA

Kaliumkanäle leiten Kaliumionen mit Raten von bis zu $\sim 10^8$ Ionen pro Sekunde. Hierbei wird K^+ gegenüber Na^+ mit einem Faktor von über 10^4 bevorzugt, obwohl der Pauling-Ionenradius nur um 0.38 \AA voneinander abweicht. Der erste hochaufgelöste Kaliumkanal, KcsA aus *Streptomyces lividans*, wurde von MacKinnon in 1998 publiziert (**Abb. 1.13**).^[83] Auf Grundlage der strukturellen Einsichten in den tetrameren Kanal wurden seitdem verschiedenste Modifikationen durchgeführt. Der Selektivitätsfilter des Kanals wird durch mehrere Carbonyl-Sauerstoffatome gebildet, die eintretende Ionen von ihrer Solvathülle

befreien, an deren Stelle treten und somit die Ionen hindurchleiten. Der Kanal kann in einem kollabierten Zustand vorliegen, der bei niedriger K^+ -Konzentration vorherrscht und keine Ionen leitet. Bei hoher K^+ -Konzentration wird der Kanal in einen leitfähigen Zustand überführt.

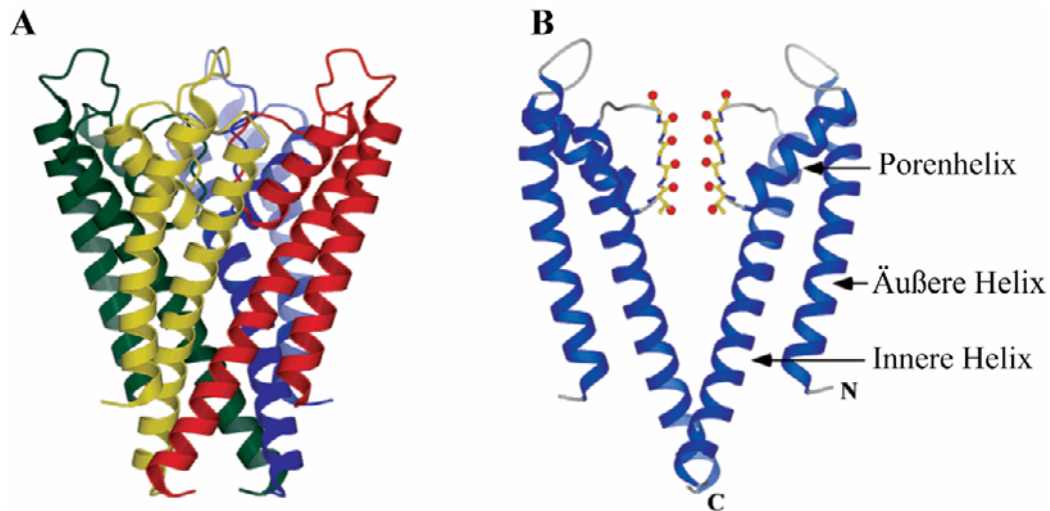


Abbildung 1.13: Der Kalium-Kanal aus *S. lividans*. (A) Seitenansicht auf KcsA mit unterschiedlich eingefärbten Monomer-Einheiten. (B) Zwei Untereinheiten des Kanals mit gezeigtem Selektivitätsfilter im Stick-Modell mit den Carbonyl-Sauerstoffatomen in rot.

Das Aminosäure-Motiv TVGYG des Selektivitätsfilters ist streng konserviert und wurde in einem chemosynthetischen Ansatz modifiziert (Abb. 1.14).^[79] Hierzu wurde der membrandurchspannende Teil des Proteins, der strukturell charakterisiert wurde und den Aminosäuren 1-125 entspricht, in zwei Fragmente zerlegt. Das N-terminale Fragment (aa 1-73) wurde mittels Intein-GST-Fusionsprotein rekombinant überproduziert und der GST-Tag proteolytisch abgetrennt. Durch chemische Ligation wurde dieses Fragment mit dem über Boc-SPPS synthetisierten C-terminalen Peptid verknüpft.

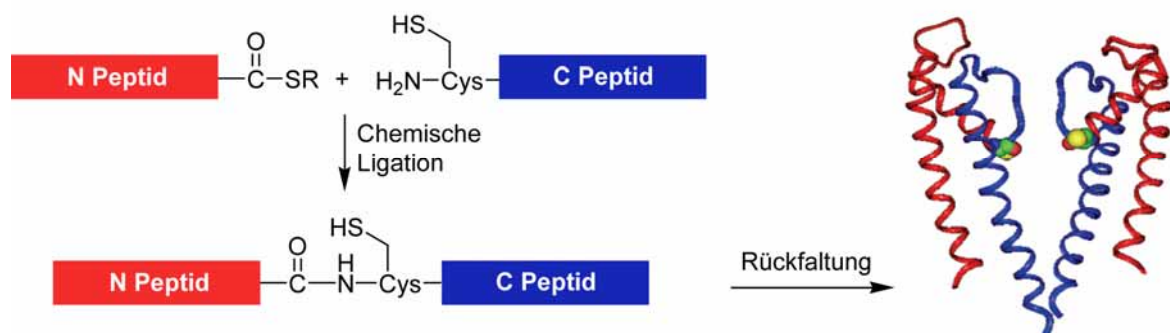


Abbildung 1.14: Schema zur Erzeugung der verkürzten semisynthetischen KcsA-Pore. Das N-terminale Peptid (rot, aa 1-73) wurde durch rekombinante Expression erzeugt; das C-terminale Peptid (blau, aa 74-125) wurde durch SPPS synthetisiert. Nach erfolgter Ligation wurde das Protein zurückgefaltet, die Ligationsstelle ist im CPK-Modell dargestellt.

Nach Rückfaltung zeigte sich, dass der Kanal eine geringe Öffnungswahrscheinlichkeit aufgrund der fehlenden 35 Aminosäuren besaß. Eine erzeugte Mutante (A98G) behob dieses Problem und der semi-synthetische Kanal zeigte die erwartete Funktionalität.^[84] Als weitere Modifikation wurde die Amidbindung zwischen Tyr78 und Gly79 im Selektivitätsfilter durch eine Esterbindung ausgetauscht.^[85] Dadurch verringerte sich die Leitfähigkeit des Kanals um 50% und änderte die Selektivität für K^+ , Rb^+ und Cs^+ innerhalb des Filters, wie durch die Darstellung der Elektronendichte in **Abb. 1.15 C und D** gezeigt.

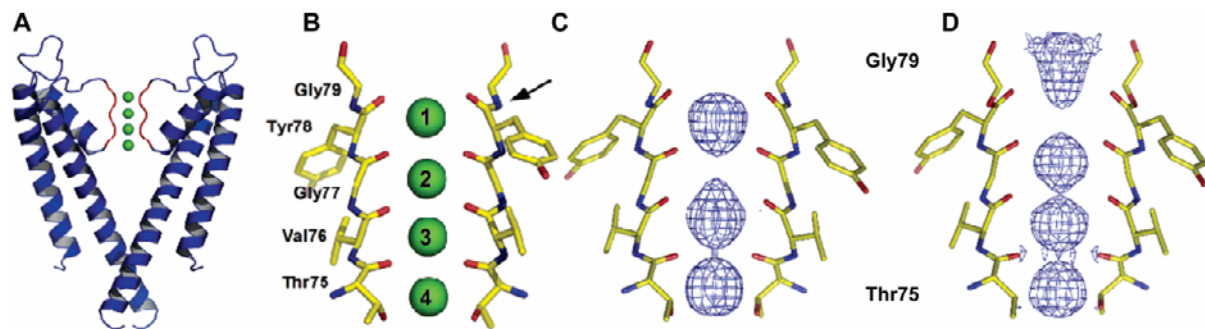


Abbildung 1.15: Im Selektivitätsfilter des KcsA-Kanals wurde die Amidbindung zwischen Tyr78 und Gly79 durch eine Esterbindung ausgetauscht (markiert durch den Pfeil). (A) Zwei Monomereinheiten mit Selektivitätsfilter (rot) und K^+ -Atomen (grün). (B) Zoomansicht auf den Selektivitätsfilter im *Stick*-Modell mit den K^+ -Atomen (grün). (C) KcsA Wildtyp mit gebundenen Rb^+ -Atomen (nur Elektronendichte gezeigt). (D) Estermodifikation des Selektivitätsfilters mit gebundenen Rb^+ -Atomen (nur Elektronendichte gezeigt).

Weiterhin wurde die Rolle von Gly77 im Selektivitätsfilter studiert.^[86] Dieser konservierte Rest nimmt eine links-händige helikale Konformation ein, die nur für D-Aminosäuren zugänglich ist. Daher wurde dieser Rest durch D-Ala substituiert, was in einem funktionellem Kanal resultierte, während der Austausch gegen L-Ala einen funktionsuntüchtigen Kanal zur Folge hatte.

Der spannungsabhängige K^+ -Ionenkanal der *Shaker*-Familie

Die spannungsabhängigen K^+ -Ionenkanäle (K_v) der *Shaker*-Familie gehören zu best-untersuchtesten Kanälen und spielen eine zentrale Rolle bei der Verarbeitung elektrischer Impulse. So sind sie unter anderem für die Aufhebung des Membranpotentials nach Anregung der Zelle verantwortlich. Die Kanäle werden durch die Bindung des Antagonisten Tetraethylammonium (TEA) am Selektivitätsfilter geschlossen. Trauner und Kramer stellten auf Basis des *Shaker* H4 K^+ -Kanals aus *Drosophila melanogaster* einen durch Licht steuerbaren Kanal her (**Abb. 1.16**).^[87] Hierfür wurde der Rest Glu422, der in passender Distanz von 15 – 18 Å von der TEA-Bindungsstelle entfernt liegt, ausgewählt und zu einem

Cystein mutiert. Durch Anknüpfung mittels Maleimid-Chemie wurde der Lichtschalter MAL-AZO-QA eingeführt, der in seiner gestreckten *trans*-Konformation eine Länge von 17 Å aufweist. Nach Bestrahlung mit Licht mit einer Wellenlänge von 380 nm liegt die *cis*-Konformation mit einer Länge von 10 Å vor. Hier bindet der positiv-geladene Ammoniumrest an die Bindungsstelle und verschließt so den Kanal. Der mutierte Kanal wurde sowohl in *Xenopus laevis* Oozyten als auch in Neuronen aus dem Rattenhippocampus exprimiert und erlaubte die Steuerung des Aktionspotentials, was in potentiellen Behandlungen von neuronalen Schäden oder Degenerationen resultieren könnte.

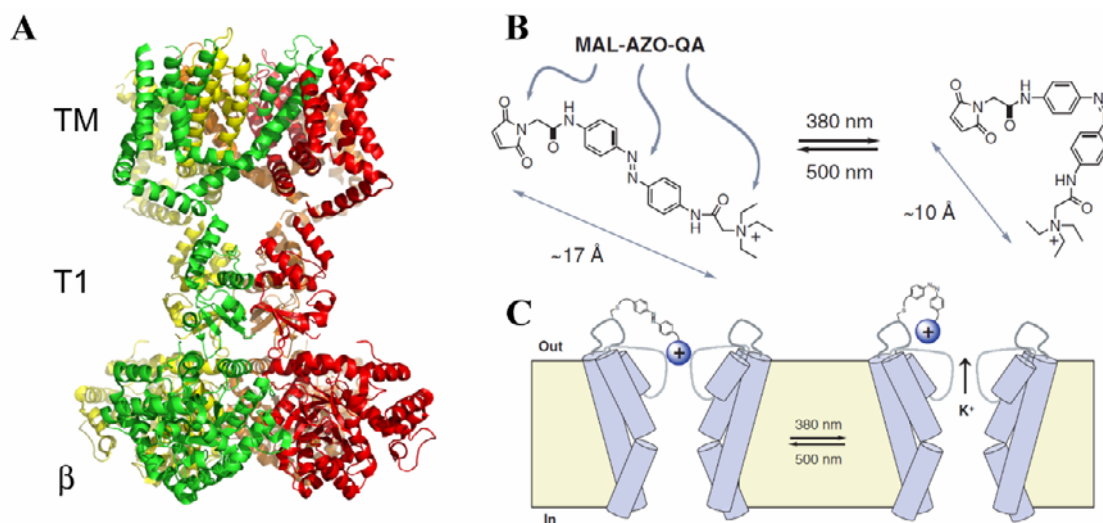


Abbildung 1.16: (A) Seitenansicht des eukaryontischen tetrameren *Shaker* K⁺-Kanals (PDB-Code: 2A79, TM: transmembrane Einheit) in Komplex mit der T1-Einheit, die als Docking-Plattform für die β-Einheit dient (Aldo-Keto-Reductase-Enzym). (B) Der Photoschalter *Maleimid-Azo-Quarternäres-Ammoniumion* kann reversibel durch Licht zwischen der *E*- und *Z*-Konformation geschaltet werden. (C) Schema des modifizierten Kanals mit angeknüpftem MAL-AZO-QA in offener und geschlossener Konformation auf Grundlage des bakteriellen *Shaker* K⁺-Kanals aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mth; PDB-Code 1LNQ).

Der ligandengesteuerte ionotrope Glutamat-Rezeptor

Der Glutamat-Rezeptor ist ein Typ von mehreren bekannten ligandengesteuerten Ionenkanälen. Er bildet ein Tetramer und ist für den Influx von Natrium und Calcium in die Zelle verantwortlich. Der Kanal besteht aus mehreren Domänen und wird nach Bindung von Glutamat durch eine Konformationsänderung in der transmembranen Domäne (TMD) aktiviert (Abb. 1.17 A-C). Der Kanal wurde ähnlich wie der *Shaker* K_v-Kanal von Trauner und Isacoff mit einem Photoschalter versehen, der ebenfalls über ein Cystein/Maleimid angeknüpft wurde.^[88] Der Azo-Photoschalter enthält Glutamat als Agonist und kann in zwei Konformationen vorliegen (Abb. 1.17 D). In der *Z*-Konformation bindet Glutamat in der

Ligandenbindungsdomäne (LBD) und ermöglicht die Öffnung des Kanals durch allosterische Wechselwirkung mit der TMD.

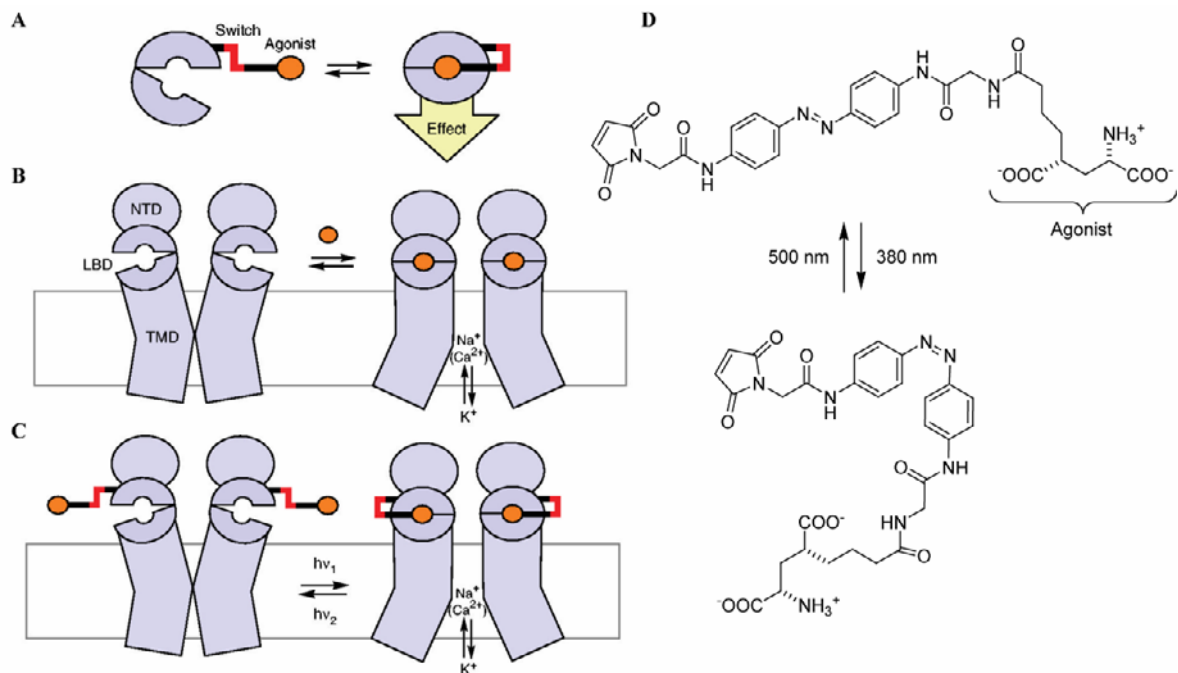


Abbildung 1.17: Schema und Wirkungsweise des Photoschalters, der an den ionotropen glutamat-Rezeptor angeknüpft wurde. (A) Der Azo-Schalter wurde an die LB-Domäne angeknüpft. Nach Belichtung mit 380 nm findet eine $E \rightarrow Z$ -Konversion statt, der Agonist Glutamat bindet an die LBD und es kommt zu einem Effekt. (B) Schema der Konformationsänderung des Kanals nach Glutamatbindung mit Domänenanordnung (NTD: N-terminale Domäne; LBD: Ligandenbindungsdomäne; TMD: Transmembrane Domäne). (C) Schema des durch den Photoschalter hervorgerufenen Effektes. (D) Struktur des Photoschalters in E - und Z -Konformation.

Das heptamere α -Hämolysin

Das aus *Staphylococcus aureus* stammende Exotoxin α -Hämolysin besteht aus 293 Aminosäuren und bildet ein aus sieben Peptidketten bestehendes Homooligomer. Die sehr stabile Pore mit der Form eines Pilzes (Abb. 1.18 A) besitzt eine Länge von 100 Å und weist an der engsten Stelle einen Durchmesser von 20 Å auf.^[89] Bayley führte zahlreiche Modifikationen und Untersuchungen an dieser Pore durch, von denen hier die wichtigsten kurz erläutert werden.

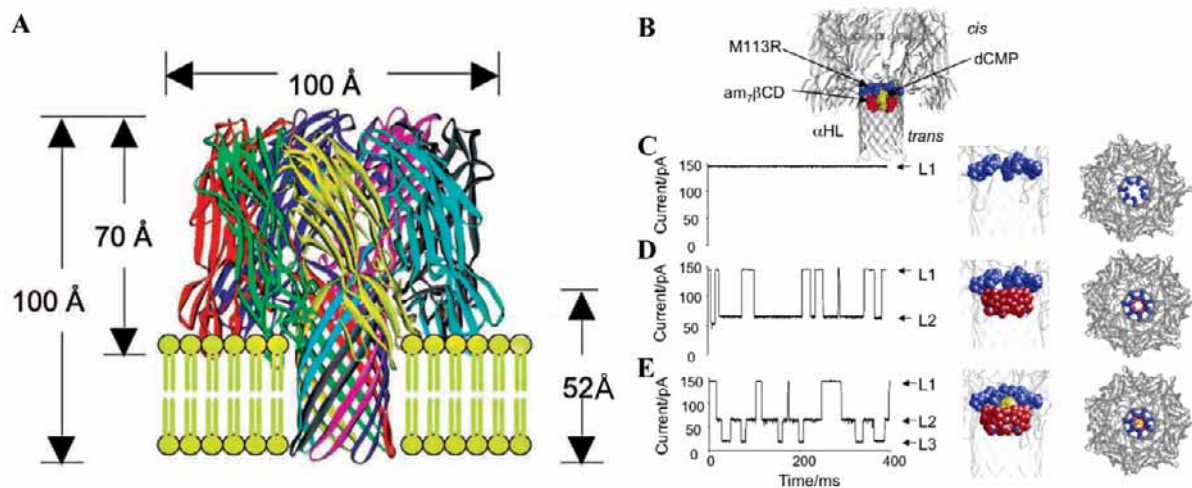


Abbildung 1.18: Übersicht über das bakterielle Toxin α -Hämolysin und daran durchgeführte Cyclodextrin-Modifikation. (A) Seitenansicht auf das Homooligo-Heptamer. (B) Design der Cyclodextrin-modifizierten Pore, bei der Met113 gegen Arg (Blau) ausgetauscht wurde, sodass das Cyclodextrin-Derivat $\text{am}_7\beta\text{CD}$ (Rot, N-Atome in Blau) binden kann. Das dCMP-Nukleotid (Gelb) bindet an das Cyclodextrin durch elektrostatische Wechselwirkungen. (C) Stromspur von $\alpha\text{-HL}-(\text{M113R})_7$ bei 130 mV; L1 entspricht der unbesetzten Pore. (D) Stromspur nach Zugabe von $40\ \mu\text{M}$ $\text{am}_7\beta\text{CD}$ in die *trans*-Messkammer und Ausbildung eines neuen Leitniveaus (L2). (E) Stromspur nach weiterer Zugabe von $5\ \mu\text{M}$ dCMP in die *cis*-Messkammer und Bildung eines dritten Leitniveaus (L3) verursacht durch dessen Bindung an den $\alpha\text{-HL}-(\text{M113R})_7 \cdot \text{am}_7\beta\text{CD}$ -Komplex.^[78, 90]

So wurde eine Mutante erzeugt, bei der Methionin 133 gegen Arginin ausgetauscht wurde. Diese bindet den molekularen Adapter (heptakis(6-deoxy-6-amino))- β -cyclodextrin ($\text{am}_7\beta\text{CD}$) innerhalb der Pore (Abb. 1.18 B-E). Durch *stochastic sensing* wird eine charakteristische Änderung des Stromflusses, der durch die Pore fließt, nach Zugabe eines potentiellen Interaktionspartners detektiert. Dieser Begriff wurde von Bayley geprägt und meint die Detektion eines Analytmoleküls mittels einer einzelnen Pore, bei der Aussagen über die Konzentration und die Moleküart des Analyten gegeben werden können.^[91] So wird z. B. der Stromfluss charakteristisch nach Zugabe von Ribonucleosiden und Desoxyribonucleosid-5'-monophosphaten moduliert, die an das Ammoniumion des Cyclodextrins binden können.^[90] Dieser Effekt eröffnet potentielle Anwendungen für die DNA-Sequenzierung.

Die Erzeugung der Doppelmutante (M113F/K147N)₇ führte nach Bindung des chiralen Cyclodextrin-Adapters zu einer Pore, mit der Enantiomere von z. B. Ibuprofen und Thalidomid aufgrund der unterschiedlichen Leitfähigkeiten differenziert werden konnten (Abb. 1.19).^[92] Durch das Einbringen von

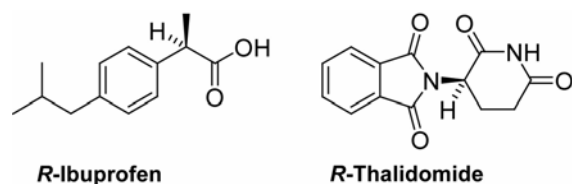


Abbildung 1.19: Untersuchte Enantiomere durch α -Hämolysin-(M113F/K147N)₇, ausgestattet mit einem β -Cyclodextrin-Adaptermolekül.

aromatischen Aminosäuren in die Pore (M113W)₁₋₇ konnten nitroaromatische Verbindungen wie 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) in einer Probe nachgewiesen werden.^[93] Ein photoschaltbares Hämolyisin wurde durch Anknüpfung eines Azo-Derivates an α -HL-(WT)₆-(T117C-D8)₁ erzeugt, bei dem die heterooligomere Pore mit dem Chlor-Acetamid-Baustein **1** umgesetzt wurde.^[94] Nach Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 380 nm wurde eine *trans*→*cis*-Konformationsänderung beobachtet, die eine Änderung des Stromflusses von 3 pA erzeugte und thermisch stabil gegenüber der Relaxation des Photoschalters war (**Abb. 1.20 A**). **Abb. 1.20 B** zeigt die erhaltene Messspur.

Mittels Einzelkanalmessungen konnte eine Molekül-Inversion beobachtet werden, die an einzelnen Molekülen stattfand. So wurde an eine einzelne Cystein-Mutante (α -HL-(WT)₆-(G137C)₁) eine arsenhaltige Sulfonverbindung kovalent während einer Messung gebunden, die Inversion der chiralen As^{III}-Zentrums gemessen und die Geschwindigkeitsrate bestimmt (**Abb. 1.20 C**).^[95]

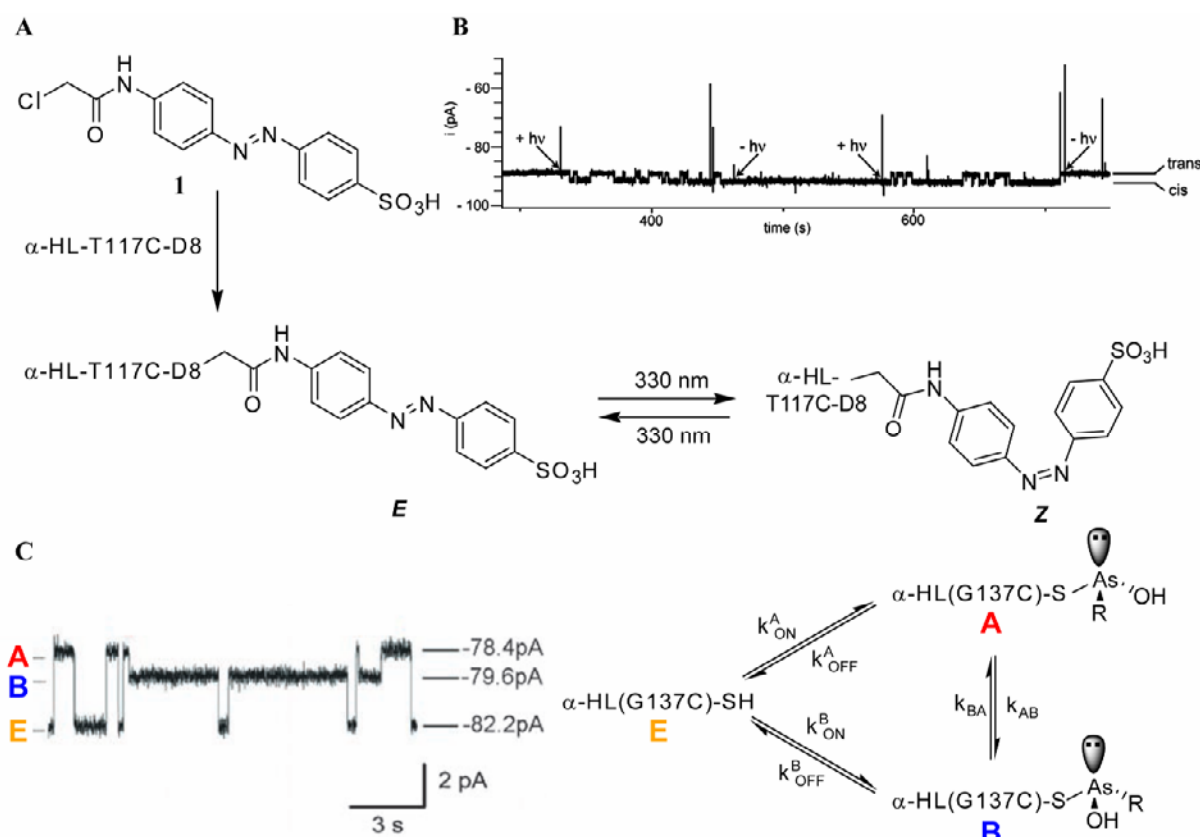


Abbildung 1.20: Cystein-vermittelte Modifikation des α -Hämolyisins. **(A)** Schema des Photoschalters, der an α -HL-T117C-D8 angeknüpft wurde, und dessen *cis/trans*-Isomere. D8 steht für einen octa-Aspartat-Rest, der zur Isolierung der (WT)₆(T117C)₁-Spezies diente. **(B)** Stromspur des unter (A) erzeugten Kanals. Das Niveau der *cis/trans*-Zustände ist markiert und die Bestrahlung durch Pfeile markiert. **(C)** Stromspur der α -HL-Cysteinmutante, bei der während der Messung die Arsenverbindung zugegeben wurde, und Niveaus der Inversionsprodukte.

Der MscL-Kanal

Der *mechanosensitive channel of large conductance* (MscL) aus *E. coli* dient dem Abbau von osmotischem Stress. Ein erhöhter Turgordruck, verursacht durch hypotonische Bedingungen, stellt eine Bedrohung für die Zelle dar. Als Reaktion darauf werden konformationelle Änderungen im MscL-Kanal initiiert, der sich nun öffnet und den Zelldruck durch Austausch von Ionen, Wasser und Molekülen ausgleicht. In Eukaryonten vorkommende mechanosensitive Kanäle sind bekannt für ihr Mitwirken bei Empfindungen wie Schwerkraft, Berührungen, Hören und der kardiovaskulären Regulation.

Auf Grundlage der hochaufgelösten Röntgenstruktur^[96] des geschlossenen MscL-Kanals aus *E. coli* wurde *protein engineering* von Feringa durchgeführt (**Abb. 1.21 A, B**).^[97] Es wurde eine Mutante erzeugt, bei der Gly22 gegen Cys ausgetauscht wurde. Diese Aminosäure sitzt etwa in der Mitte der pentameren Pore. Nach Anknüpfung von verschiedenen Photoschaltern über Iodacetamid-Labeling sollten die in der Pore vorherrschenden *van der Waals*-Interaktionen gestört werden, die die Pore in einem geschlossenen Zustand halten. Die in **Abb. 1.21 C** gezeigte Iodo-spiropyran-Verbindung wurde kovalent an das Cystein gebunden. Nach Illumination liegt der Schalter in einem zwitterionischen Zustand vor, und durch den damit verbundenen Polaritätswechsel innerhalb der Pore kommt es zu einer reversiblen Öffnung des Kanals.

Feringa erzeugte mehrere pH-abhängige Kanäle, indem basische Verbindungen in den Kanal eingeführt wurden.^[98] Bereits bei einem pH-Wert von 6 kommt es zu einer Protonierung, wodurch der Kanal durch das Einbringen positiver Ladungen in einen offenen Zustand überführt wurde (**Abb. 1.21 D**). In einem weiteren Schritt koppelte Feringa beide Schalter-Strategien zusammen und erzeugte licht- und pH-abhängige MscL-Kanäle. Die MscL-G22C-Mutante wurde mit einem *ortho*-Nitrobenzyl-Derivat umgesetzt (**Abb. 1.21 E**). Der geschlossene Kanal wurde nach UV-Licht-Bestrahlung und pH-Verschiebung zu pH 5.7 in einen offenen Kanal überführt.

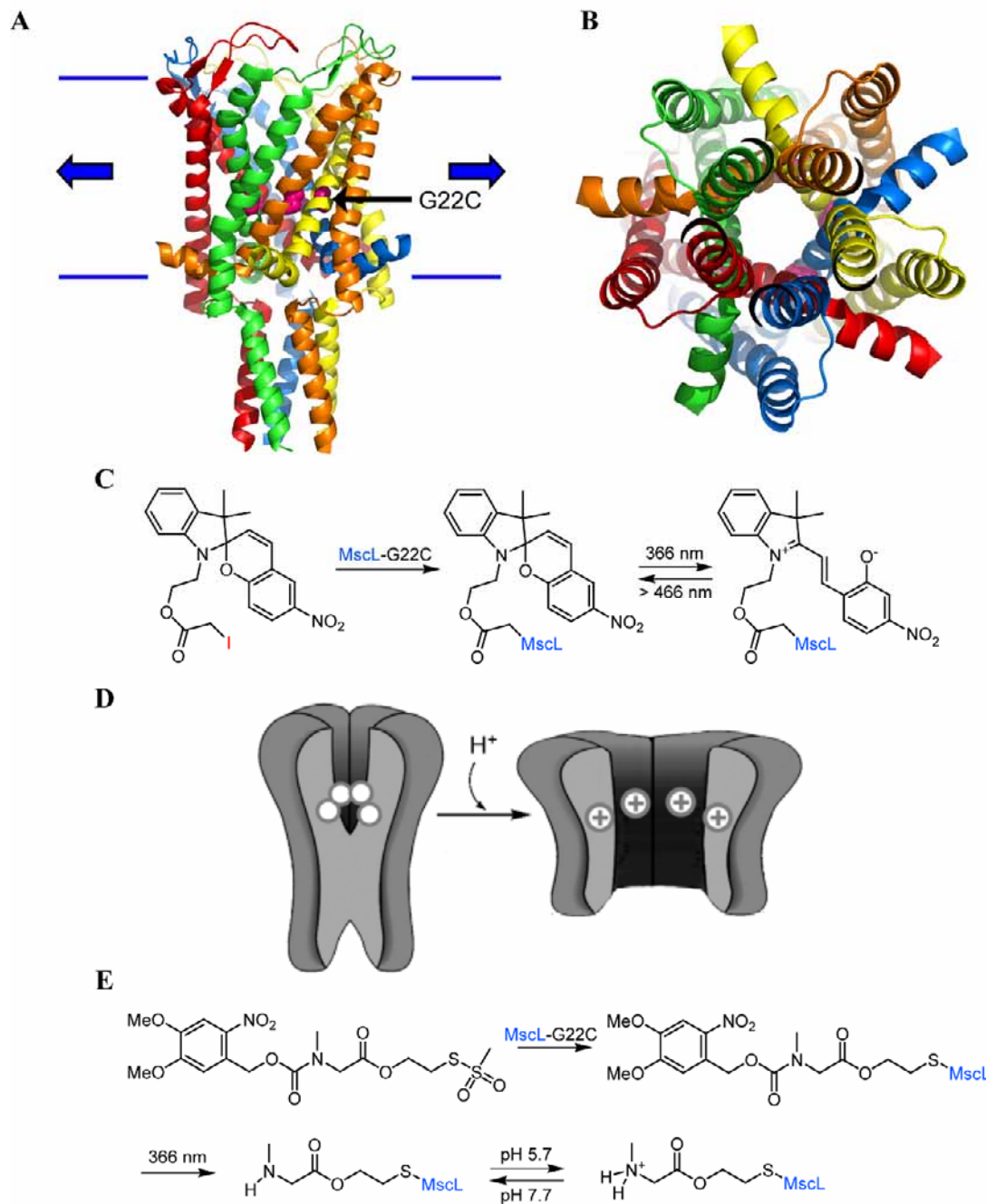


Abbildung 1.21: Der mechanosensitive MscL-Ionenkanal und eingeführte Licht- bzw. pH-Schalter. **(A)** Seitenansicht auf den MscL-Kanal (PDB-Code: 2OAR); die Pfeile markieren die laterale Richtung der Konformationsänderung, die beim Öffnen bzw. Schließen durchlaufen wird. **(B)** Aufsicht auf den Kanal. **(C)** Schema des an die G22C-Mutante angeknüpften Iodo-spiropyrans in zwei reversiblen durch Licht schaltbaren Zuständen (Spiropyran \rightleftharpoons Merocyanin). **(D)** Schema des pentameren Kanals. Protonierung der hydrophoben Porenregion führt zu konformationellen Änderungen und zur Kanalöffnung. **(E)** Das basische *ortho*-Nitrobenzyl-Derivat wurde in den MscL-Kanal eingeführt. Nach UV-Lichtbestrahlung konnte der Schalter pH-abhängig den Kanal öffnen und schließen.

Das Gramicidin A

Das aus 15 Aminosäuren bestehende Gramicidin A (gA) aus *Bacillus brevis* verfügt über einen Formyl-N- und Aminoethanol-C-Terminus (**Abb. 1.22 A**). Durch die alternierende Anordnung von D- bzw. L-Aminosäuren kommt es zur Bildung von β -helikalen Sekundärstrukturelementen.^[99] gA bildet in der Membran ein Kopf-zu-Kopf-Dimer aus, das aus zwei rechtsgängigen einzelsträngigen β -Helices besteht. Der Kanal befindet sich nur dann in einem offenen Zustand, wenn sich beide Monomere zusammen lagern (**Abb. 1.22 B**).

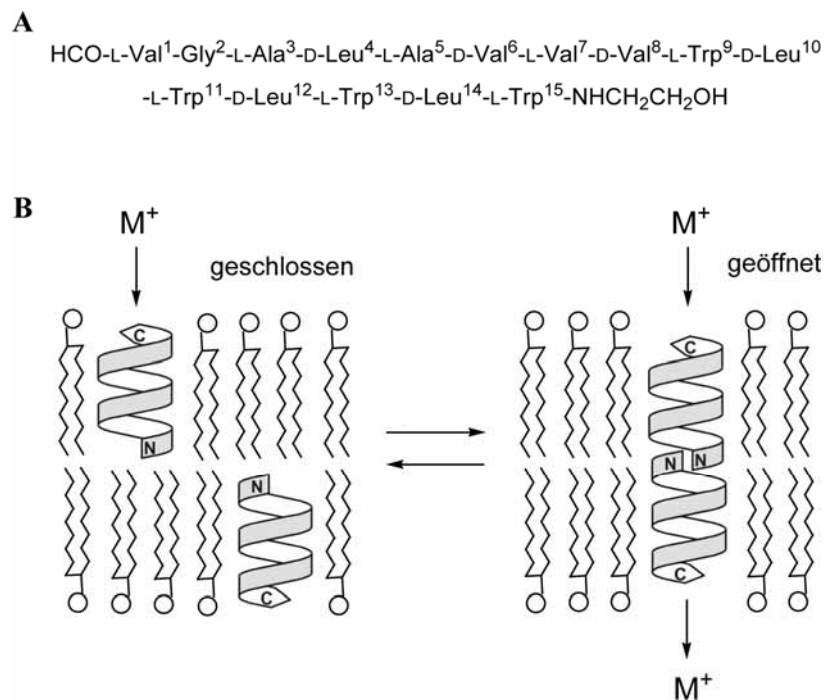


Abbildung 1.22: Gramicidin A. (A) Aminosäuresequenz. (B) Einlagerung in die Membran und Bildung des Kopf-zu-Kopf-Dimers.

gA weist eine niedrige Eisenman I-Selektivität für monovalente Alkaliionen auf ($\text{Cs}^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Li}^+$). Gramicidin-Hybride wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Koert mit dem Ziel synthetisiert, sowohl die Ionenselektivität als auch die Ionenpräferenz zu verändern.^[100, 101] Durch Anknüpfung von chiralen Cyclohexylether (CHE)-Aminosäuren an der zentrale Eintrittsstelle des Kanals wurden weitere Bindungsstellen für Kationen eingeführt, die zu einer erhöhten Ionenselektivität von $\text{Cs}^+:\text{K}^+$ von 10:1 gegenüber 2:1 für den Wildtyp führten (**Abb. 1.23 A**). Die Funktion dieses Hybrids wurde *in vivo* untersucht und zeigte eine gewisse Cs-Spezifität sowie die Funktion eines Wasserkanals.^[102]

Ein weiteres gA-Hybrid wurde synthetisiert, bei dem D-Leucin gegen D-Lysin ausgetauscht sowie eine Aza-18-Krone-6 eingeführt wurde (**Abb. 1.23 B**).^[101] Dieses hybride gA zeigte eine verminderte Leitfähigkeit für Cs^+ und eine erhöhte Leitfähigkeit für K^+ . Verursacht wurde dieser Effekt wahrscheinlich dadurch, dass die Kaliumionen die Pore vollständig dehydratisiert durch die Krone betreten können, während die Cäsiumionen an der Krone vorbei in den Kanal eintreten (**Abb. 1.23 C**).

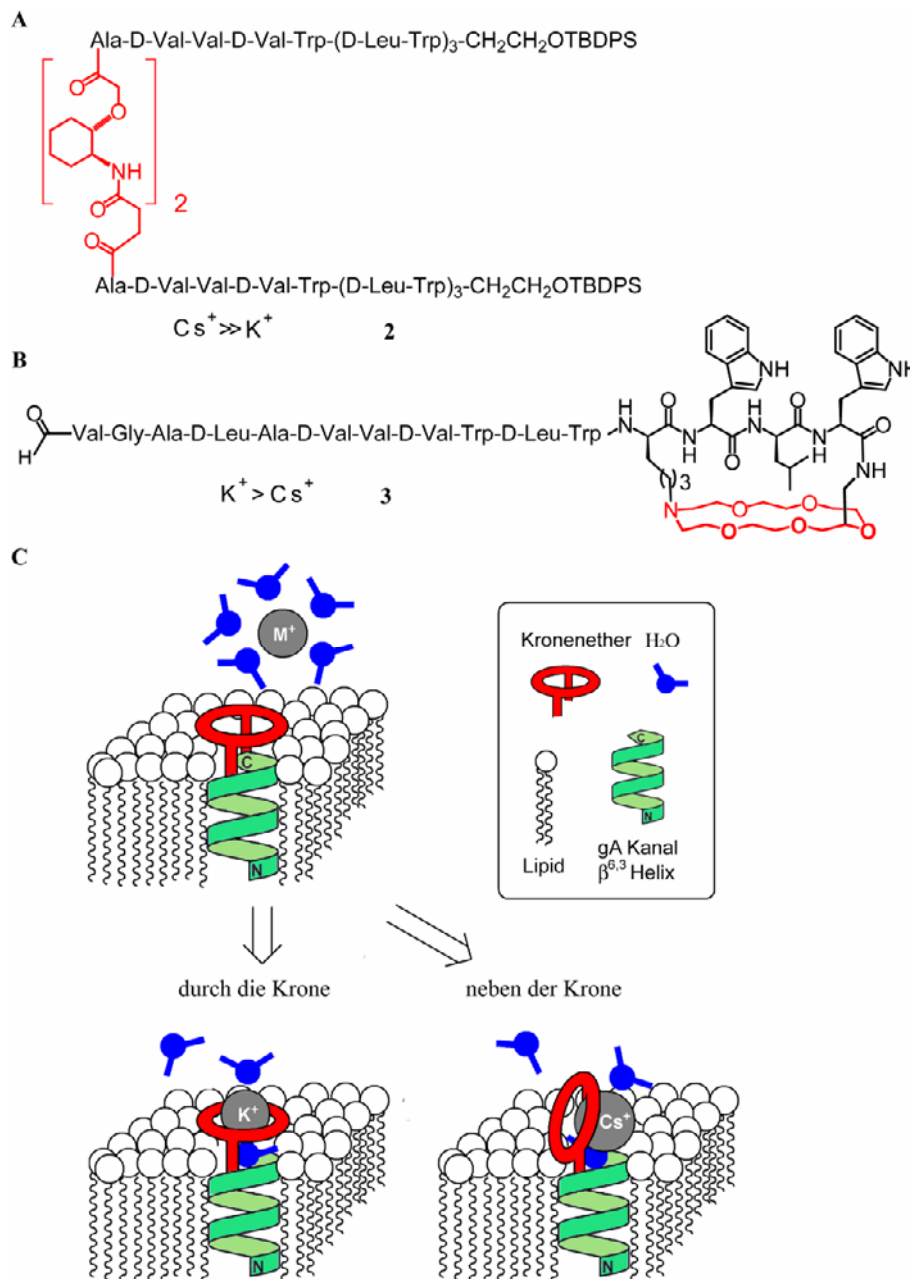


Abbildung 1.23: Protein engineering am Beispiel von Gramicidin A. (A) Nach Einbau des chiralen Cyclohexyl-Ethers in gA wurde eine erhöhte Spezifität von Cs^+ gegenüber K^+ gefunden. **(B)** Struktur des gA-Azo-18-Krone-6-Ethers nach Austausch von Leu12 gegen Lys, dessen ϵ -N-Atom sowie das C-terminale Ethanolamin Teil der Krone sind. **(C)** Schematische Darstellung des Ionentransports von K^+ und Cs^+ durch das Hybrid **3**.

Weiterhin wurde von Koert ein polyether-verknüpftes Gramicidin-Derivat synthetisiert, das als Mono- oder Zwillingskanal in der Membran vorliegt (**Abb. 1.24 A**).^[103] Es stellte sich heraus, dass der favorisierte Zustand abhängig von der Beschaffenheit der Membrandicke sowie deren Rigidität ist.

Die Inkorporation einer Tetrahydropyran (THP)-Aminosäure an Position 11 und 12 in das Gramicidin A führte zu einer Spezies, die eine erhöhte Eisenman I-Spezifität sowie eine ionenabhängige Verweildauer des Kanals in der Membran aufwies (**Abb. 1.24 B**).^[104]

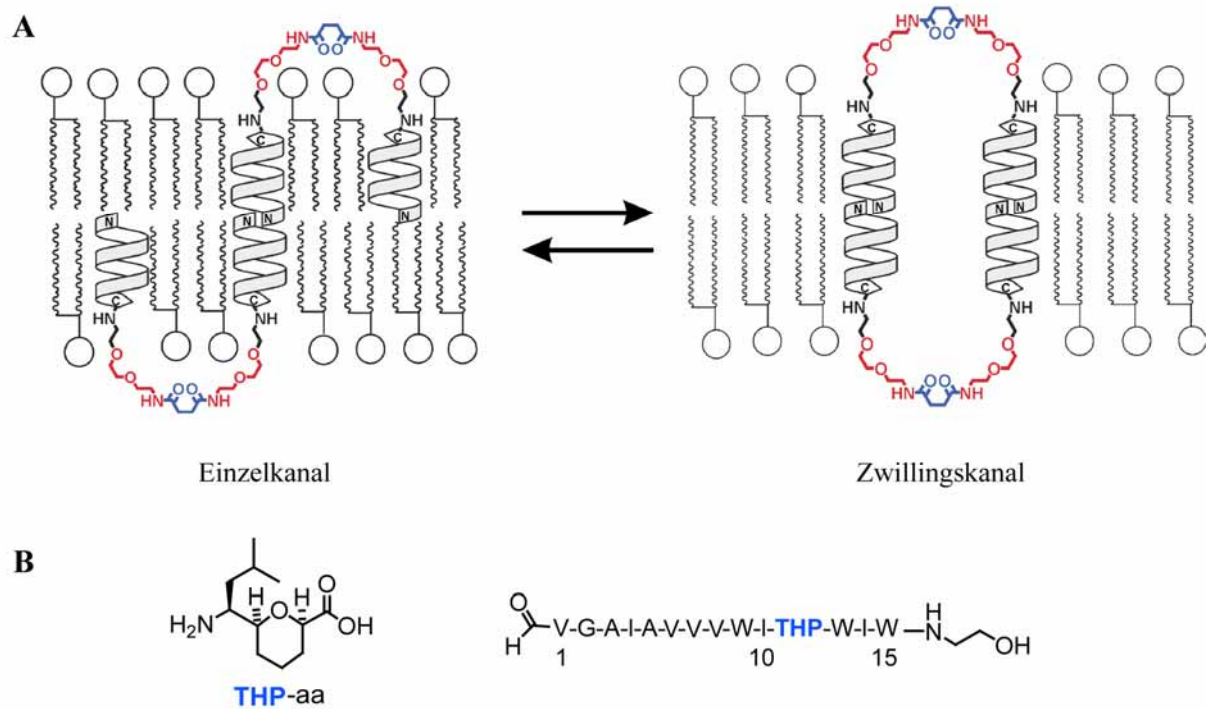


Abbildung 1.24: (A) Struktur des Zwillingskanals von Gramicidin A. (B) Schema der Tetrahydropyran-Aminosäure und Sequenz nach Einbau in das Oligopeptid.

1.2.2. Beispiele für das *de novo* design von Ionenkanälen

In der Literatur sind verschiedene Formen und Anordnungen von synthetischen Ionenkanälen bekannt. Matile entwickelte Ionenkanalaktive Poren auf Grundlage sogenannter *rigid-rods*.^[82, 105] Hierfür wurden Peptidstränge basierend auf *p*-octiphenyl synthetisiert, die sich zu einem β -Fass zusammenlagern können (Abb. 1.25 A). Durch den Einbau aromatischer Substituenten bildet sich eine π -Helix aus, die nach Interkalation von Liganden in ein aktives β -Fass überführt wird (Abb. 1.25 B).

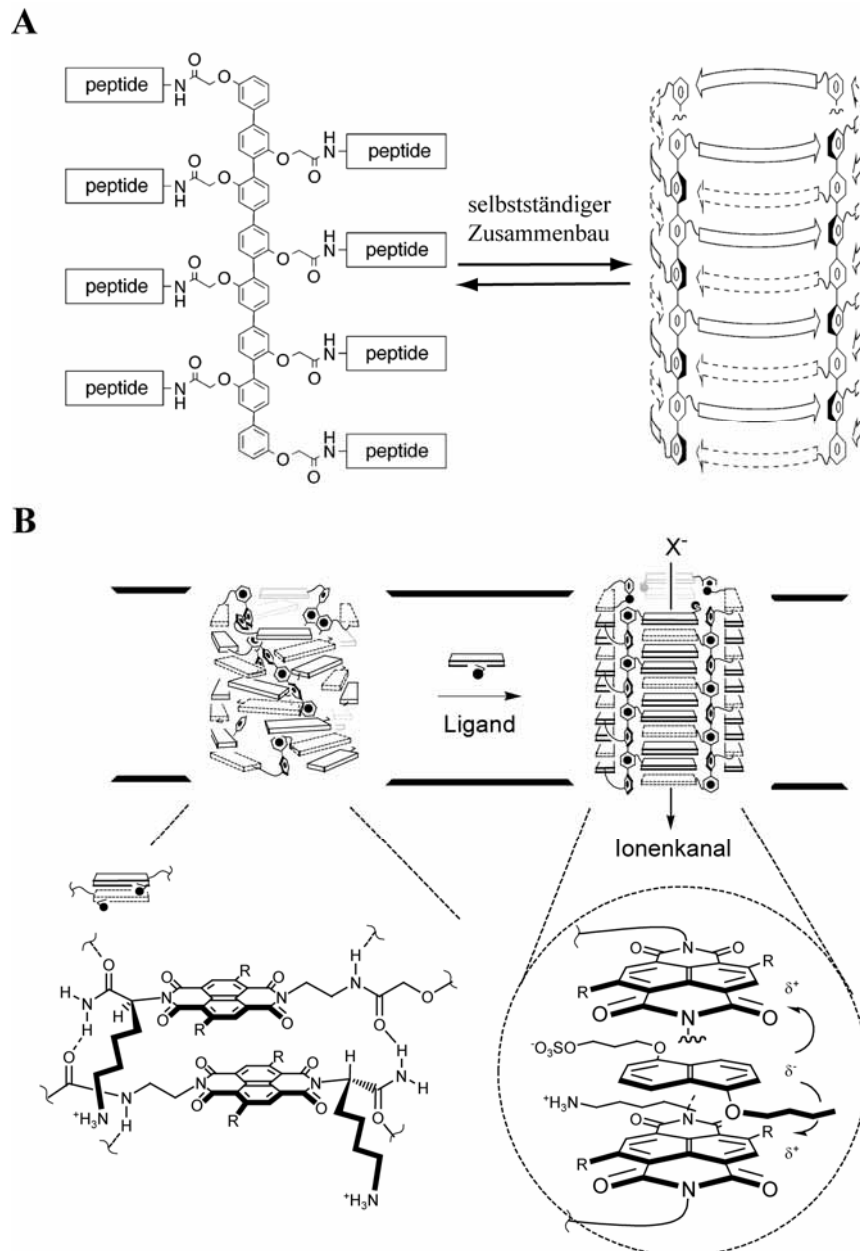


Abbildung 1.25: Synthetische Ionenkanäle generiert durch *rigid-rods*. **(A)** Bildung eines β -Fass. **(B)** Umwandlung einer π -Helix in einen aktiven Ionenkanal durch Interkalation eines Liganden.

Als ein weiteres Beispiel von vielen möglichen ist der sog. *rigid push-pull rod* gezeigt (**Abb. 1.26 A**), der als formstabile α -Helix eingeführt wurde, um die Rolle von Dipolen im Zusammenhang spannungsabhängiger Kanäle zu untersuchen.^[106, 107] Das axiale Dipolmoment wurde durch einen π -Donor und einen π -Akzeptor eingeführt. Die Kronenethergruppen wurden eingesetzt, um funktionale Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen angelegtem Potential und Dipolmoment durchzuführen. Strukturelle Änderungen konnten hierbei durch Fluoreszenzänderungen detektiert werden. Es zeigte sich eine erhöhte Aktivität bei angelegtem Potential. In **Abb. 1.26 B** ist ein π -azides oligomeres Naphthalenderivat gezeigt, das nach Einlagerung in die Membran einen Transport von Anionen

durch sogenannte *anion π -slides* ermöglicht.^[108] Ein weiterer synthetischer Ionenkanal für einen *cation π -slide* wurde ebenfalls von Matile synthetisiert.^[109]

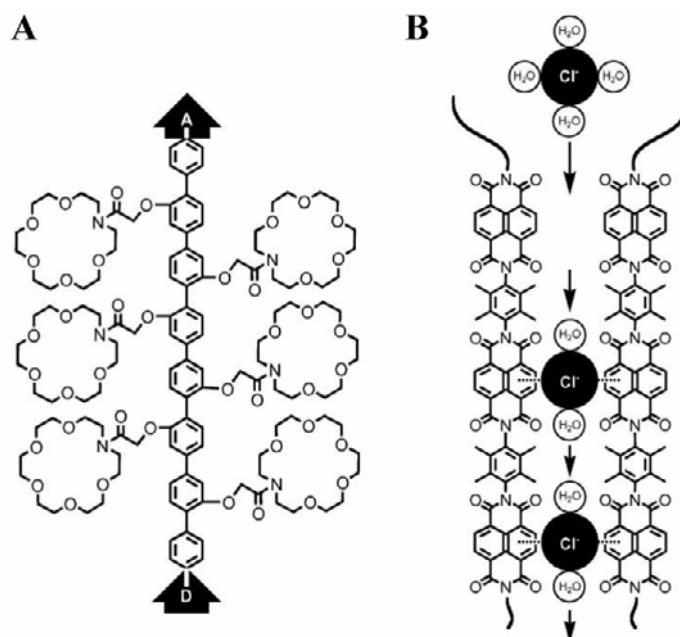


Abbildung 1.26: Schematische Darstellung synthetischer Ionenkanäle basierend auf *rigid-rod* Bausteinen. (A) *Rigid push-pull rod* basierend auf *p*-octiphenyl mit Kronenether-Substituenten, A: π -Akzeptor; D: π -Donor. (B) Anionenselektive Kanäle durch Assemblierung von oligo-(*p*-phenylen)-*N,N*-naphtalendiimid.

Gokel studierte die Aktivität von hydrophilen synthetischen Ionenkanälen wie z. B. **4** in Phospholipidmembranen (**Abb. 1.27 A**).^[110] Die Länge der Alkylseitenkette zwischen den Azakronen wurde variiert und unterschiedliche Transportaktivitäten konnten bestimmt werden.

Der synthetische Aminocyclodextrin Ionenkanal **5** wurde von Gin entwickelt. Steigende pH-Werte führten zu einer erhöhten Aktivität für einen Anionen- und Kationentransport durch den Kanal.

Als letzter synthetischer Kanal **6** ist an dieser Stelle der von Voyer gezeigt, der aus einem multiplen Kronenether-substituierten α -helikalen Peptid besteht.^[111] Die Enden des Peptids wurden durch verschiedene Estergruppen und/oder polyhydroxylierte Gruppen modifiziert und die Eigenschaften untersucht. Die vermutete Sekundärstruktur dieses Kanals ist in **Abb. 1.27 B** dargestellt.^[112]

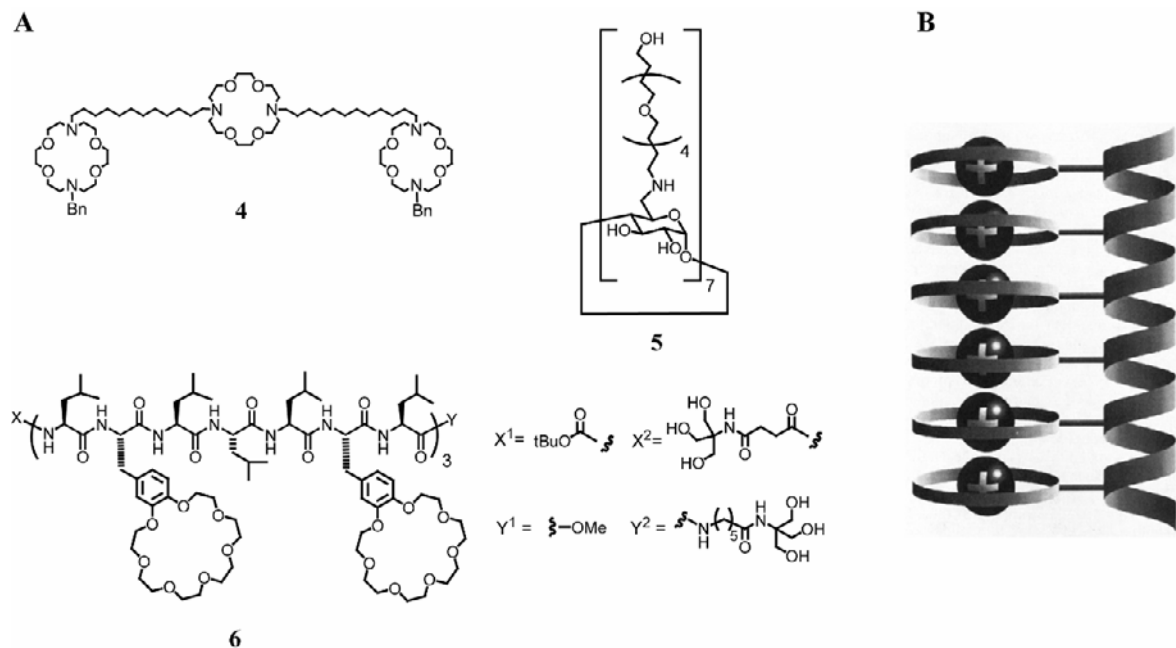


Abbildung 1.27: Verschiedene Strukturen, aus denen synthetische Ionenkanäle aufgebaut sind (A) und die vermutete Sekundärstruktur von 6 (B).^[112]

1.2.3. Anwendungsgebiete modifizierter Ionenkanäle

Ionenkanäle ermöglichen die gezielte Aufnahme von Ionen nahe ihrem Diffusionslimit in Wasser und gewährleisten dabei eine hohe Spezifität. Sie nehmen eine zentrale Stellung in der Detektion von (Umwelt)Einflüssen, der muskulären Kontrolle und der neuronalen Signaltransduktion ein. Ihre einzigartigen Eigenschaften prädestinieren die Ionenkanäle als Zielmoleküle für z. B. synthetische Modifikationen und bieten letztlich eine Vielzahl von möglichen Anwendungen. Darüber hinaus sind die β -Fass-artigen Kanäle von einer bemerkenswerten Stabilität gegenüber erhöhter Temperatur, Proteasen und verschiedener chemischer Substanzen gekennzeichnet, was sie ideal für *protein engineering* macht.

Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der Ionenkanäle ist grundlegend, um den molekularen Mechanismus zu verstehen. Somit können gezielt Modifikation im Kanal vorgenommen werden, um diese für andere Applikationen nutzbar zu machen. Obwohl die Zahl der bekannten Strukturen von Membranproteinen deutlich langsamer zunimmt als die der löslichen Proteine, ist mittlerweile derzeit eine Vielzahl von Membranproteinstrukturen verfügbar (Stand der PDB im März 2009: 183; Quelle: http://blanco.biomol.uci.edu/membrane_proteins_xtal.html).

Modifizierte Ionenkanäle finden bereits in verschiedensten Anwendungsgebieten Verwendung oder werden für eine potentielle Applikation vorbereitet. Als wesentliche Bereiche seien an dieser Stelle der medizinisch-pharmazeutische und der sensorische Bereich

sowie eine Anwendungsmöglichkeit in der Halbleitertechnik genannt. Konkrete Beispiele werden in Kapitel 5.6 aufgeführt und erläutert.

1.3. OmpF als Templatstruktur zur Erzeugung synthetisch modifizierter Biohybride

In der vorliegenden Arbeit wurde OmpF als Templatstruktur ausgewählt, um über unterschiedliche Modifikationsreaktionen Biohybride darzustellen (siehe Kapitel 1.4 und 3.4 – 3.7), da es die folgenden Voraussetzungen erfüllt:

- (i) OmpF ist ein strukturell bestens untersuchtes Protein. Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur ist nötig, um die zu modifizierenden Positionen lokalisieren zu können.
- (ii) OmpF wurde in zahlreichen Studien und Untersuchungen funktionell charakterisiert, was einen Vergleich mit Literaturdaten ermöglicht.
- (iii) Für OmpF existiert ein Rückfaltungsprotokoll, sodass das Protein in Form von denaturierten *inclusion bodies* produziert und anschließend rückgefaltet werden konnte. Somit konnten größere Mengen für die strukturelle und funktionelle Charakterisierung produziert werden.
- (iv) OmpF verfügt als ein Vertreter der β -Fass-artigen Porine aus der äußeren Membran über eine bemerkenswerte Stabilität gegenüber erhöhter Temperatur, Proteasen und verschiedener chemischer Substanzen, was es ideal für *protein engineering* macht.

1.4. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, auf Grundlage des bereits strukturell charakterisierten trimeren Porins OmpF aus *E. coli* hybride OmpF-Kanäle chemoenzymatisch zu entwickeln. Zur Verwirklichung dieses Ziels sollten verschiedene Methoden angewendet werden. Hierzu zählten die Festphasensynthese eines 26-meren Oligopeptides, in das eine nicht-natürliche Aminosäure inkorporiert werden sollte, sowie die Klonierung und schließlich die rekombinante Überproduktion von OmpF-Fragmenten und –Mutanten. Die N- bzw. C-terminalen Fragmente sollten via Native Chemische Ligation miteinander verknüpft werden. Alternativ sollten über Cystein-Mutanten Modulatoren über eine S-Alkylierungs-Reaktion angeknüpft werden. Die auf diese Weise erzeugten denaturierten OmpF-Hybride sollten in den nativen Zustand durch Rückfaltung überführt werden. Dabei stellte sich die

Frage, wann der optimale Zeitpunkt für eine Anknüpfung synthetischer Modulatoren war – vor oder nach der nativen chemischen Ligation bzw. vor oder nach der Rückfaltung? Eine entscheidende Fragestellung war ebenfalls, Aussagen über den Umsatz einer Reaktion treffen zu können. Die Reaktionen sollten möglichst vollständig ablaufen, um gemischte Hybride nach Möglichkeit zu vermeiden, da die Trennung von modifiziert / unmodifiziert schwer durchzuführen ist.

Abschließend sollten die modifizierten Porine auf zwei Wegen charakterisiert werden: zum einen elektrophysiologisch durch Anwendung von *Black Lipid Membrane*-Einzelkanalmessungen, und zum anderen strukturell durch Proteinkristallisation mit anschließender röntgenkristallographischer Vermessung. Durch diese Untersuchungen sollte ebenfalls die Art der Anknüpfungsreaktion, die sich durch die Beschaffenheit der inkorporierten Gruppen in die Pore unterscheiden, untersucht werden.

2 Material

2.1. Geräte

Gerät	Typenbezeichnung und Hersteller
Analytik	
HPLC-MS	Agilent 1100 HPLC-System (<i>Agilent Technologies</i> , Waldbronn) Finnigan LTQ-FT (<i>Thermo</i> , Rockford, IL, USA)
BLM-Apparatur	
Messaufbau	<i>Luigs & Neumann GmbH</i> , Ratingen
Patch-clamp amplifier; zugehörige Software	AxoPatch 200 B (<i>Axon Instruments</i> , Foster City, CA, USA)
Messapparatur	Bessel-8-Pol 1 kHz-Tiefpassfilter und DigiData A/D-Wandler 1200B (5 kHz) (<i>Frequency Devices</i> , Ottawa, IL, USA)
Küvette, Messkammer	CP2A, BCH-22A (<i>Warner Instruments</i> , Hamden, CT, USA)
FPLC/HPLC-Systeme, Pumpe und verwendete Säulen	
ÄKTApurifier™ 100	bestehend aus: Box 900, Fraktionskollektor Frac 950, Monitor pH/C- 900, Monitor UV-900 Pumpe P-900 (<i>GE Healthcare</i> , Freiburg)
ÄKTAprime™	<i>GE Healthcare</i> , Freiburg
FPLC-Anlage	<i>Pharmacia</i> FPLC-System 250 bestehend aus: Gradienten- Programmer GP-250 plus, Pumpe P-500 (2x), Uvicord Opt. Einheit UV-1 (mit 280 nm Filter), Uvicord Kontrolleinheit UV-1, 2-Kanal-Flachbettschreiber REC-102, Injektionsventil V-7, 3-Wege Magnetventil PSV-100, Fraktionssammler FRAC-100 (<i>Pharmacia</i> , Freiburg)
Schlauchpumpe	Peristaltic pump P1 (<i>Pharmacia</i> , Freiburg)
Ionentauschersäule	HiTrap DEAE Sepharose FF, 1 mL (<i>Amersham</i> , Freiburg)
Gelfiltrationssäule	Superdex 200 16/60 pg (<i>Amersham</i> , Freiburg)
Dokumentation	
Digitalkamera	Nikon D70s (<i>Nikon</i> , Japan)
Dokumentationssystem für Kristallisationsscreens	Crystal Pro HT 110 (<i>TriTek Corporation</i> , Sumerduck, USA)
Geldokumentationssystem	Computer E.A.S.Y. (<i>UVP</i>), Kamera (<i>UVP</i>), UV-Schirm (<i>Herolab</i>), Thermodrucker UP-D 895 (<i>Sony</i> , Berlin)
Mikroskope	B601 (<i>Olympus</i> , Hamburg)

	MZ8 (<i>Leica</i> , Wetzlar)
Scanner	Perfection 1650 (<i>Seiko Epson</i> , Japan)
UV-Bandpassfilter	BP-590, Ø 58 mm (<i>Schneider-Kreuznach</i> , Bad Kreuznach)
Elektrophorese-Systeme	
Agarosegele	Feinmechanik (<i>Philipps-Universität</i> , Marburg)
SDS-PAGE	Elektrophoresekammern und Gelträger für PAGE Mighty Small II SE250 (<i>Hoefer Scientific</i> , San Francisco, USA)
	Spannungsversorgung EPS 300/301 (<i>Pharmacia</i> , Freiburg):
Inkubation	
Brutschrank	<i>Binder</i> (Tuttlingen)
Schüttelinkubatoren	<i>New Brunswick</i> (N.Y., USA)
	Multitron 2 (<i>Infors AG</i> , Basel, Schweiz)
	Certomat IS (<i>Sartorius</i> , Göttingen)
Thermomixer	Comfort & Compact (<i>Eppendorf</i> , Hamburg)
Kristallisation und Röntgenquelle	
Kristallisationsroboter	Cartesian Microsys™ SQ4000 (<i>Genomic Solutions</i> , Huntingdon, GB)
Kristallisationsplatten (96 well)	<i>Greiner Bio-One</i> (Frickenhäusen)
	<i>Innovadyne Technologies</i> (Carnforth, GB)
Röntgendiffraktometer	Drehanode AXS FR591 (<i>Bruker</i> , Karlsruhe) und MAR345dtb
	Detektor (<i>MAR Research</i> , Norderstedt); Cryokühlung: <i>Oxford Cryosystems</i> (Oxford, GB)
Molekularbiologische Geräte	
Elektroporator	MicroPulser (<i>Biorad</i> , München)
Robocycler	RoboCycler® 96 Gradient Cycler (<i>Stratagene</i> , La Jolla, CA, USA)
Peptidfestphasensynthese	
Gefriertrockner	GT2 (<i>Leybold-Heraeus</i> , Hürth), Pumpe AMEB 90 SY4 R3 (<i>AEG</i> , Stockholm, Schweden)
Synthesizer	Apex 396 (<i>Advanced ChemTech</i> , CreoSalus, Kentucky, USA)
CD-Spektropolarimeter, UV/VIS-Spektralphotometer und Zubehör	
CD-Spektropolarimeter	J-810 (<i>Jasco</i> , Gross-Umstadt)
UV/VIS-Spektralphotometer	U-2000 (<i>Hitachi</i> , Tokio, Japan)
	Ultrospec 3100 pro (<i>Pharmacia</i> , Freiburg)
Quarzküvetten	(<i>Hellma GmbH & Co KG</i> , Müllheim)

Zellaufschluss

Emulsifier	EmulsiFlex-C5 (<i>Avestin</i> , Ottawa, Kanada)
French-Press	French Pressure Cell Press 5.1 (<i>SLM Aminco</i> , Urbana, USA)

Sonstige Laborgeräte

Analysenwaagen	LabStyl 54 (<i>Mettler-Toledo</i> , Giessen) DeltaRange® PC2200 (<i>Mettler-Toledo</i> , Giessen)
Autoklav	<i>Webeco</i> (Bad Schwartau) T-line™ (<i>Fedegari</i> , Albuzzano, Italien)
pH-Meter	Digital pH-Meter pH525 (<i>wtw</i> , Weilheim)
Pipetten	Research variabel (<i>Eppendorf</i> , Hamburg)
Reinstwasseranlage	Seralpur Pro90CN (<i>Seral</i> , Celle)
Zentrifugen	Centrifuge 5417 C (<i>Eppendorf</i> , Hamburg) Biofuge pico/fresco (<i>Heraeus Kendro</i> , Hanau) Centrikon T-2070 (<i>Tegimenta</i> , Schweiz) J2-HS, J2-M/E, J2 (<i>Beckmann</i> , Fullerton, CA, USA)

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Geräte**2.2. Chemikalien, Enzyme und weitere Verbrauchsmaterialien**

Die nachfolgend aufgeführten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in höchster Qualität von den Firmen *Fluka* (München), *Roth* (Karlsruhe) und *Merck* (Darmstadt) bezogen. Für die Kristallisationsexperimente wurden ausschließlich Chemikalien der Firma *Fluka* in BioChemika Ultra oder p.a. Qualität verwendet.

Produkt	Hersteller
Agarose	<i>Invitrogen Ltd.</i> (Paisley, UK)
Ampicillin	<i>Applichem</i> (Darmstadt)
Azido-Verbindungen	
Ethidiumbromid-Monoazid	<i>Molecular Probes/Invitrogen Ltd.</i> (Paisley, UK)
Bimane-Azid	
Anilin-Azid	<i>Fluka/Sigma-Aldrich</i> (Steinheim)
BCA-Assay	<i>Interchim</i> (Mannheim)
BioBeads SM-2	<i>Biorad GmbH</i> (Hamburg)
Bis-Maleimid-Reagenz BM(PEG) ₃	<i>Pierce / Thermo</i> (Rockford, IL, USA)
Bradfordreagenz	<i>Biorad GmbH</i> (Hamburg)
BSA	<i>Applichem GmbH</i> (Darmstadt)

Coomassie-Brilliant Blue R-250	<i>Serva Electrophoresis GmbH</i> (Heidelberg)
Detergenzien	<i>Bachem</i> (Weil am Rhein)
Dialysemembranen / -einheiten	<i>Millipore</i> (Bad Schwalbach) <i>SpectraPor</i> (Rancho Dominguez, CA, USA) <i>Pierce / Thermo</i> (Rockford, IL, USA)
DNA-Marker peqGOLD Range Mix	<i>peqlab Biotechnologie GmbH</i> (Erlangen)
DNA-Leiter	
DNA-Polymerase (Phusion High Fidelity)	<i>Finnzymes</i> (Espoo, Finnland)
DTT	<i>Biomol GmbH</i> (Hamburg)
Einmalküvetten Plastibrand® PS	<i>BrandGmbH & Co KG</i> (Weinheim)
Elektroporationsküvetten (2 mm gap)	<i>VWR</i> (Darmstadt)
Entsalzungssäulen PD 10	<i>GE</i> (München)
Enzyme, T4-DNA-Ligase	<i>New England Biolabs</i> (Frankfurt/Main)
Gelfiltrations-Kalibrierkit	<i>GE Healthcare</i> (Freiburg)
IPTG	<i>Gerbü</i> (Gaiberg)
Kanamycin	<i>AppliChem GmbH</i> (Darmstadt)
Kristallisationsscreens	Basic Screen, Cryo Screen, Extension Screen (<i>Sigma</i> , München); EasyXtal Classics Suite, Classics Lite Suite, MbClass I+II Suite, PACT Suite, JCSG Suite (<i>QIAGEN</i> , Hilden)
Kristallisationszubehör	
VIEWseal™-Klebefolien,	<i>GreinerBioOne</i> (Frickenhäusen)
96 well CrystalQuick™-Platten	
Deckgläser (21 mm Durchmesser), VDX-	<i>Hampton Research</i> (Aliso Viejo, CA, USA)
Platten, Cryoschleifen und Zubehör	
Konzentratoren (Amicon)	<i>Millipore</i> (Bad Schwalbach)
Lipide	
L- α -Phosphatidylethanolamin, P8193	<i>Sigma</i> (München)
L- α -Phosphatidylcholin, P3556	
Membran	<i>Spectra/Por</i> (Breda, Niederlande)
Nährmedien	<i>Difco Laboratories</i> (Detroit, USA)
Oligonukleotide	<i>Invitrogen Ltd.</i> (Paisley, UK)
Peptidfestphasensynthese	
2-Chlorotriylchlorid Harz	<i>Iris Biotech</i> (Marktredwitz)
HOBt·H ₂ O	
HBTU	
DMF	<i>Biosolve</i> (Valkenswaard, Holland)
MeOH, DCM	<i>Merck Bioscience</i> (Darmstadt)
DIPEA	<i>Sigma-Aldrich</i> (München)
Plasmid Mini & Midi Kits	<i>QIAGEN GmbH</i> (Hilden)
Proteinkonzentratoren	<i>Millipore</i> (Bad Schwalbach)
Proteinmarker peqGOLD Protein-Marker-I	<i>peqlab Biotechnologie GmbH</i> (Erlangen)
<i>QuikChange</i> ®-Ortsspezifisches Mutagenese Kit	<i>Stratagene</i> (Cedar Creek, TX, USA)

QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
Säulen	
Ionentauscher: HiTrap DEAE-Sepharose FF (1 mL)	GE Healthcare (Freiburg)
Gelfiltration: Superdex 200 16/60 pg	
Sterilfilter:	
Ultrafree-MC (0.22 µm)	Millipore (Bad Schwalbach)
Filtropur S (0.20 µm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Trypsin	Sigma (München); HPLC-Grade: Promega (Mannheim)
Ultrafree MC-Säulen	Millipore (Bad Schwalbach)
Vektoren	Novagen (Darmstadt)

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien & Chemikalien

2.3. Vektoren

In dieser Arbeit kamen die Vektoren pET-20b(+) und pET-28a(+) zum Einsatz, die detaillierte Vektorkarte findet sich in **Abb. 2.1**.

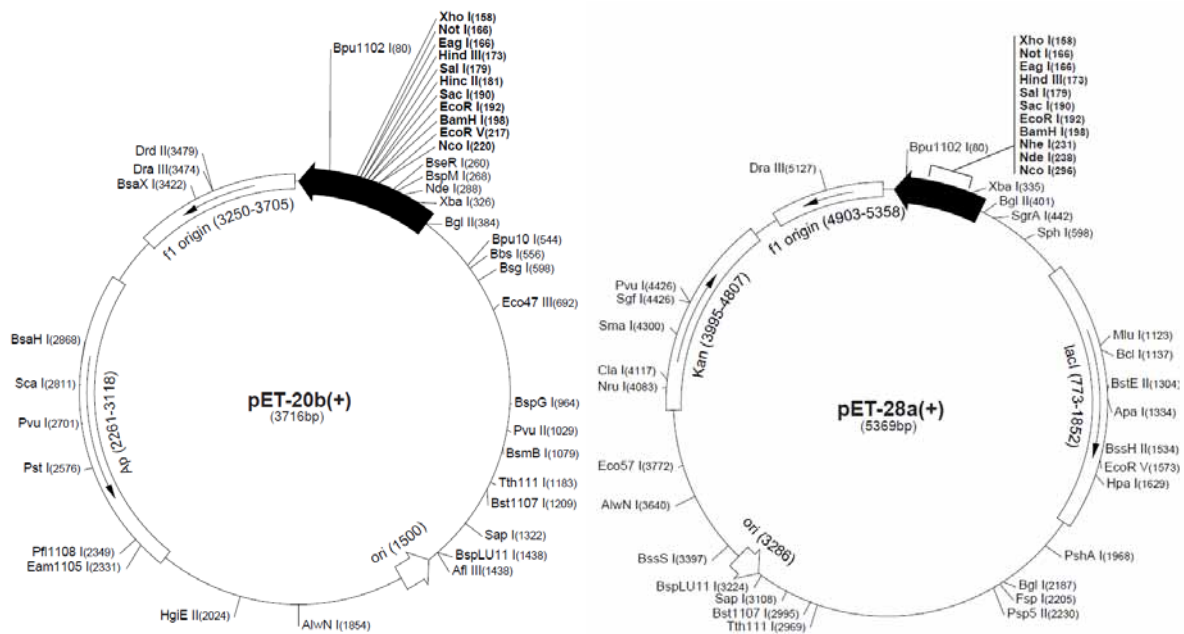


Abbildung 2.1: Übersicht über die beiden verwendeten Vektoren.

2.4. Mikroorganismen

2.4.1. *E. coli* DH5 α

Genotyp: *supE44 Δ lacU169 f80 lacZ Δ M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

Dieser Stamm wurde aufgrund seiner hohen Transformationseffizienz zur Transformation von Ligationsansätzen und zur Vervielfältigung von Plasmiden eingesetzt. Elektrokompente Zellen wurden zur Transformation von DNA nach ortsspezifischer Mutagenese und chemisch kompetente Zellen zur Retransformation von Plasmiden eingesetzt.

2.4.2. *E. coli* BL21(DE3)-Gold

Genotyp: B strain F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r gal λ (DE3) *endA* Hte

Der *E. coli* Stamm BL21(DE3) mit dem Genotyp F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) ist als bakterieller Wirtsorganismus zur Genexpression von Plasmiden mit T7-Promotor bekannt und zeichnet sich durch einen Mangel an *lon* (Protease) und *ompT* (Protease der Außenmembran) aus. Eine weitere Besonderheit ist eine IPTG-induzierbare T7-RNA-Polymerase, deren Strukturgen nach *lacZ* und dem *lacUV5* Promotor auf dem Prophagen DE3 im Chromosom des Stammes insertiert ist. Dies schafft die Voraussetzung, um für Gene unter T7-Promotorkontrolle ebenfalls eine mit IPTG induzierbare Expression zu erreichen.

2.4.3. *E. coli* BL21(DE3)-Gold *omp8* und *omp9*

Genotyp: F⁻, *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ gal λ (DE3), Δ *lamB ompF*::Tn5 Δ *ompA* Δ *ompC*

Für die Expression des *ompF*-Gen's wurden von Koebnik *et al.* konstruierte Expressionsstämme auf Basis von *E. coli* BL21(DE3)-Gold verwendet, bei dem die Gene, die für die wichtigsten Proteine der *Omp*-Familie codieren, deletiert wurden.^[113] Diese Stämme wurde verwendet, um eine „Kontamination“ der modifizierten Porine durch das *E. coli* eigene OmpF zu verhindern. Es wurden die folgenden Porine deletiert:

OmpF, LamB, OmpA und OmpC bei *omp8*; zusätzlich OmpN bei *omp9*.

Die Stämme weisen aufgrund der chromosomalen Transposons eine Resistenz gegenüber Kanamycin und Streptomycin auf.

2.5. *Medium*

In dieser Arbeit wurde ausschließlich LB (Luria Bertani)-Kulturmedium zur Überexpression verwendet. Das Medium wurde nach Lösen in dH₂O für 30 min im Autoklav bei 121 °C und 1.5 bar autoklaviert. Für die Herstellung der Agarplatten wurden 15 g/L Agar mit hinzugegeben. Das gewünschte Antibiotikum wurde direkt vor der Expression in das Medium gegeben; für die Agarplatten wurde es vor dem Gießen der Platten nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C hinzugegeben.

LB-Medium	
10 g/L	Bacto-Trypton
5 g/L	Hefeextrakt
10 g/L	Natriumchlorid
0.4 mL/L	10 M Natriumhydroxid

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des LB-Mediums

2.6. *Antibiotika*

Es wurden in dieser Arbeit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/mL sowie Kanamycin in einer Endkonzentration von 35 µg/mL verwendet.

3 Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Herstellung der Expressions-Plasmide

Die Isolierung der nachfolgend aufgeführten Plasmide wurde mit dem *QIAprep spin miniprep-Kit* nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Die Konstrukte wurden durch Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung analysiert.

Im Rahmen der Diplomarbeit von G. Studnik^[114] wurden folgende Plasmid-Konstrukte hergestellt, die für die vorliegende Arbeit von Relevanz waren:

Name	Vektorsystem	Antibiotika-Resistenz	Kommentar
pET-OMPF1	pET-28a(+)	Kanamycin	Natives OmpF mit Signalsequenz
pET-OMPF2	pET-28a(+)	Kanamycin	Natives OmpF ohne Signalsequenz
pET-OMPF3	pET-28a(+)	Kanamycin	OmpF ohne Signalsequenz und die ersten 26 aa, zusätzlich Mutation N27C

Tabelle 3.1: Übersicht über bereits erzeugte Konstrukte

Um eine Expression der OmpF-Konstrukte in dem Omp-defizienten *E. coli* Stamm omp8/omp9^[113] durchführen zu können, mussten die vorhandenen Konstrukte pET-OMPF2 und pET-OMPF3 in ein Vektorsystem mit einer anderen Antibiotika-Resistenz als Kanamycin überführt werden. Hierzu eignete sich der Vektor pET-20b(+) gewählt, da er eine Ampicillin-Kassette enthält. Zwischen beiden Vektoren wurde ein Austausch der Antibiotika-Kassette durchgeführt. Folgende Konstrukte wurden dabei erhalten:

Name	Vektorsystem	Antibiotika-Resistenz	Kommentar
pET-OMPF2'	pET-20b(+)	Ampicillin	Natives OmpF ohne Signalsequenz
pET-OMPF3'	pET-20b(+)	Ampicillin	OmpF ohne Signalsequenz und die ersten 26 aa, zusätzlich Mutation N27C

Tabelle 3.2: Übersicht über hergestellte Konstrukte

Konstruktion von *pET-OMPF2'* und *pET-OMPF3'*:

Als Templat für die Umklonierung diente das Plasmid *pET-OMPF2*. Dieses wurde ebenso wie der Ziel-Vektor *pET-20b(+)* mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *HindIII* verdaut und die beiden Fragmente mittels der T4 DNA Ligase verknüpft. Die Restriktionsanalyse wurde mit den Enzymen *DraIII* und *ClaI* durchgeführt.

Auf analoge Art und Weise wurde das Plasmid *pET-OMPF3'* präpariert.

3.1.2. Ortsspezifische Mutagenese und Konstruktion von Cystein-Mutanten

Für die Erzeugung der ortsspezifischen Mutanten von *OmpF* wurde das *QuikChange*[®]-Protokoll verwendet. Hierbei wird die doppelsträngige Plasmid-DNA denaturiert und mit zwei zueinander komplementären Oligonukleotiden versetzt, die die gewünschte Mutation beinhalten (**Abb. 3.1**). Beide DNA-Stränge wurden mit der *High-Fidelity* Phusion-DNA-Polymerase aufgefüllt, die nur eine Fehlerrate von $4.4 \cdot 10^{-7}$ Fehler pro verlängertes Basenpaar aufweist. Nach durchgeführter Mutagenese-PCR wurde die im Reaktionsmix vorhandene methylierte Eltern-DNA selektiv durch die Endonuklease *DpnI* (Erkennungssequenz: 5'-Gm⁶ATC-3') verdaut und der Reaktionsmix entsalzt.

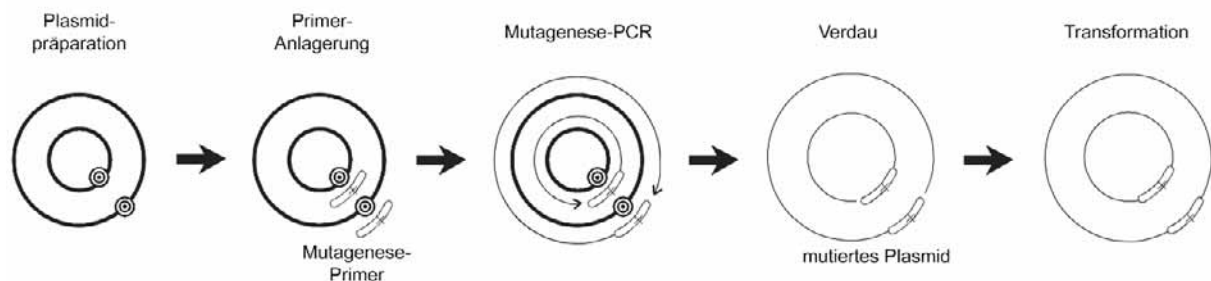


Abbildung 3.1: Schematische Übersicht der einzelnen Teilschritte einer ortsspezifischen Mutagenese.

Im Anschluss an die Mutagenese wurde 1 μ L des Reaktionsmixes zu 50 μ L elektrokompenten *E. coli* DH5 α -Zellen gegeben und mittels elektrischem Impuls (2.5 kV, 5.0 – 6.0 ms) transformiert. Der Ansatz wurde in 1 mL LB-Medium aufgenommen und für 1 Stunde bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Die Zellen wurden auf einer antibiotikahaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Die folgende **Tabelle 3.3** gibt Aufschluss über die erzeugten Mutanten, in **Tabelle 3.4** sind die verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

Bezeichnung	Konstrukt	Mutationen	Templat- Plasmid	Primer	Kommentar
pET-Cys1	pET-OMPF2'- K16C	Lys16Cys	pET-OMPF2'	1, 2	1-Punkt- Anknüpfung, Referenzmutante für BLM- Messungen
pET-Cys2	pET-OMPF2'- K16C-G119C	Lys16Cys, Gly119Cys	pET- OMPF2'- K16C	3, 4	Doppelmutante für 2-Punkt- Anknüpfung
pET-Cys3	pET-OMPF2'- K16C-G120C	Lys16Cys, Gly120Cys	pET- OMPF2'- K16C	5, 6	
pET-Cys4	pET-OMPF2'- K16C-A123C	Lys16Cys, Ala123Cys	pET- OMPF2'- K16C	7, 8	
pET-Cys5	pET-OMPF2'- K16C-S125C	Lys16Cys, Ser125Cys	pET- OMPF2'- K16C	9, 10	
pET-Cys6	pET-OMPF2'- E181C	Glu181Cys	pET-OMPF2'	11, 12	1-Punkt- Anknüpfung
pET-Cys7	pET-OMPF2'- D221C	Asp221Cys	pET-OMPF2'	13, 14	
pET-Cys8	pET-OMPF2'- Y226C	Tyr226Cys	pET-OMPF2'	15, 16	
pET-Cys9	pET-OMPF2'- N27C	Asn27Cys	pET-OMPF2'	17, 18	Referenzmutante für BLM- Messungen

Tabelle 3.3: Übersicht über die erzeugten Cystein-Mutanten

#	Sequenz 5'→3'	Länge / Basen	Zahl der <i>mismatches</i> / Basen
1	CAAAGTAGATCTGTACGGT TGCG CTGTTGGTCTGCATTATTT TTC	45	3
2	GAAAAATAATGCAGACCAACAGC GCA ACCGTACAGATCTACT	45	3

TTG			
3	GATATGCTGCCAGAATTT TGT GGTGATACTGCATACAG	38	1
4	CTGTATGCAGTATCACC ACAAA ATTCTGGCAGCATATC	38	1
5	GCCAGAATTTGGT TGT GATACTGCATACAGC	31	1
6	GCTGTATGCAGTATC ACA ACCAAATTCTGGC	31	1
7	GAATTTGGTGGTGATACT TGCT ACAGCGATGACTTC	36	3
8	GAAGTCATCGCTGTAG GCA AGTATCACCACCAAATTC	36	3
9	GTGATACTGCATAC TGCG ATGACTTCTTCG	30	1
10	CGAAGAAGTCATC GCA GTATGCAGTATCAC	30	1
11	GGTTCTATCAGCTAC TGTT ACGAAGGCTTTGG	32	3
12	CCAAAGCCTTCGTA ACAG TAGCTGATAGAACC	32	3
13	GCTACTGGTCTGAAGTAC TGCG CGAACAACATCTACCTG	39	2
14	CAGGTAGATGTTGTTTCGC GCA GTA CTTCAGACCAGTAGC	39	2
15	CGAACAACATC TGCC TGGCAGCGAAC	26	1
16	GTTTCGCTGCCAG GCA GATGTTGTTTCG	26	1
17	GCATTATTTTTCCAAGGGT TGCG GTGAAAACAGTTACG	38	2
18	CGTAACTGTTTTACCC GCA ACCCTTGGA AAAATAATGC	38	2

Tabelle 3.4: Übersicht über die verwendeten Mutagenese-Primer, Mutations-Triplett fettgedruckt.

3.1.3. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruch- oder Didesoxynucleotid-Methode nach Sanger^[115] durch die Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Die Analyse der Konstrukte ergab eine fehlerfreie Umklonierung und Mutagenese.

3.1.4. Präparation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Von einer frisch ausgestrichenen LB-Agar-Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und diese in eine 50 mL LB-Kultur mit entsprechendem Resistenzmarker überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 200 rpm. Daraufhin wurden 100 mL LB-Medium mit der Vorkultur im Verhältnis 1:100 inokuliert und die Kultur bei 37 °C und 200 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.5 – 0.6 angezogen. Nach kurzer Abkühlung wurden die Zellen pelletiert (12300g, 10 min, 4 °C) und das Pellet in 30 mL TFB I-Puffer resuspendiert. Nachdem die Zellen für zwei Stunden auf Eis inkubiert wurden, erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (12300g, 5 min, 4 °C) mit anschließender Resuspendierung in 4 mL

TFB II-Puffer. Es wurden Aliquots zu 50 µl in sterilen Eppendorfcups mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

TFB I-Puffer	TFB II-Puffer
100 mM RbCl	10 mM MOPS
50 mM MnCl ₂ ·2H ₂ O	10 mM RbCl
30 mM KOAc	75 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O
10 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O	15% (v/v) Glycerin (87%)
15% (v/v) Glycerin (87%)	

Tabelle 3.5: Pufferzusammensetzung zur Erzeugung chemisch kompetente Zellen

3.1.5. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

0.5 – 1 µL (~200 ng) des zu transformierenden Plasmids wurde zu einem Aliquot chemisch kompetenter Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte ein 90-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C, eine zwei-minütige Inkubationsphase auf Eis und die Zugabe von 950 µL vorgewärmtem LB-Medium. Die Zellen wurden bei 37 °C für 1 h unter Schütteln regeneriert, auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.1.6. Präparation elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Die Präparation elektrokompenter Zellen beruht auf einem Protokoll von Dower.^[116] Es wurde eine Einzelkolonie von einer frisch auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichenen Kultur in 50 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotika überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Aus dieser Kultur wurde eine 1 L LB-Hauptkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und die Zellen bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.7 – 0.9 bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Die Kultur wurde für 20 min auf Eis abgekühlt und pelletiert (12300g, 10 min, 4 °C). Die Bakterien wurden in 450 mL eiskaltem und sterilem bidestillierten Wasser aufgenommen und erneut pelletiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Die Zellen wurden in 450 mL eisgekühltem Glycerin (10% (v/v)) mit anschließender Zentrifugation gewaschen und schließlich in 2.5 mL kaltem Glycerin (10% (v/v)) resuspendiert. Die Zellen wurden zu 50 µL in sterilen Eppendorfcups nach schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

3.1.7. Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Etwa 100 ng Plasmid-DNA wurden zu einem Aliquot der elektrokompenten Zellen hinzugegeben. Die Suspension wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 0.2 cm gegeben und in der Elektroporationsapparatur ein Puls von 4.5 – 6 ms auf die Zellen ausgeübt. Anschließend wurden 950 µL vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben und die Zellen bei 37 °C und 200 rpm für 1 h regeneriert. Es erfolgte das Ausstreichen auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Selektionsmarker und die Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37 °C.

3.2. Proteinchemische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardtechniken der Proteinanalytik (SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung) wurden nach Laemmli^[117] und Bennett^[118] durchgeführt und werden nicht weiter beschrieben.

3.2.1. Homologe Genexpression

Zur Produktion der rekombinanten Proteine, Proteinfragmente und Mutanten wurde das gewünschte Plasmid in die folgenden Wirts-Organismen transformiert und auf einer LB-Agarplatte, die mit entsprechendem Antibiotika versetzt war, ausgestrichen:

- | | |
|---|--------------------|
| - pET-OMPF1: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | Kan ³⁵ |
| - pET-OMPF2' / 3': <i>E. coli</i> BL21 (DE3) omp9 | Amp ¹⁰⁰ |
| - pET-Cys1-9: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) omp9 | Amp ¹⁰⁰ |

3.2.1.1. Expression des nativen membranständigen OmpF

Aus einer LB-Übernachtskultur, die bei 37 °C angezogen und mit Kan³⁵ versetzt wurde, wurden 12 L LB-Medium (Kan³⁵; 2 L pro 5 L-Kolben) im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.5 – 0.6 erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG. Nach 4 h wurden die Zellen geerntet (6400g, 15 min, 4 °C) und bei 4 °C in rund 100 mL Puffer I resuspendiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.1.2. Expression der OmpF-Proteinfragmente und -Mutanten

Aus einer Übernachtskultur (LB, Amp¹⁰⁰) wurde im Verhältnis 1:50 – 1:100 eine LB-Hauptkultur (Amp¹⁰⁰) angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C und 150 rpm inkubiert und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.5 – 0.6 mit 1 mM IPTG induziert. Nach 3 – 4 h wurden die Zellen geerntet (6400g, 15 min, 4 °C) und in Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.2. Aufreinigung des nativen membranständigen OmpF

Die Aufreinigung des membranständigen OmpF wurde entsprechend der Literatur^[119] durchgeführt, jedoch mit einem verkürzten Protokoll. Hierzu wurden die Zellen aufgetaut, 1 mM EDTA und 0.2 mM PMSF zugegeben und die Zellen mittels Emulsifier aufgeschlossen. Nach einer ersten Zentrifugation (7840g, 10 min, 4 °C), die zur Abtrennung grober Zelltrümmer diente, wurde in einem zweiten Zentrifugationsschritt (25402g, 90 min, 4 °C) der Überstand erneut pelletiert. Das erhaltene Membranpellet wurde mit 7 mL Puffer II versetzt, für 30 min bei 37 °C gerührt und erneut zentrifugiert (25402g, 90 min, 4 °C). Im Anschluss wurden fünf Vorextraktionen des Pellets durch Zugabe von 9 mL Puffer III, rühren für 60 min bei 37 °C (alternativ bei 4 °C über Nacht) und Zentrifugation (25402g, 90 min, 4 °C) durchgeführt. Bei den unter gleichen Bedingungen folgenden fünf Hauptextraktionen wurde die Detergenzkonzentration auf 3% erhöht. Die vereinigten Extraktionen wurden mittels Konzentrator (MWCO 50 kDa) eingengt und steril filtriert (0.45 µm Filter, Sartorius). Die Lösung wurde auf eine Superdex 200 16/60 pg Säule aufgetragen, die mit 3 CV Säulenpuffer vorequiliбриert war. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, aufkonzentriert und gegen den gewünschten Puffer dialysiert. Die Reinheit des Proteins wurde durch SDS-PAGE verifiziert. Nach Abschluss aller Reinigungsschritte wurde eine totale Proteinmenge von durchschnittlich 8 mg entsprechend 0.7 mg/L Zellkultur erhalten.

Puffer I	Puffer II	Puffer III	Säulenpuffer
50 mM	0.1 M	20 mM	20 mM
Na-Phosphat; pH 7.6	K-Phosphat; pH 6.6	Na-Phosphat; pH 7.6	HEPES; pH 7.2
100 mM NaCl	20 mM MgSO ₄	3 mM DTT	100 mM NaCl
5% Saccharose	3 mM NaN ₃	0.5/3.0% octyl-POE	0.5% octyl-POE

Tabelle 3.6: Pufferzusammensetzung für die Aufreinigung des Wildtyp OmpF

3.2.3. Aufreinigung der OmpF-Proteinfragmente und -Mutanten in Form von *inclusion bodies*

Die Aufreinigung der Proteine in Form von *inclusion bodies* erfolgte nach dem Aufschluss mittels Emulsifier und einem ersten Zentrifugationsschritt (25402g, 30 min, 4 °C). Die pelletierten bräunlichen *inclusion bodies* wurden insgesamt fünfmal mit Puffer [W1 (2x), W2 (1x) und W3 (2x)] in einem Potter-Homogenisator resuspendiert und nach jedem Waschschritt abzentrifugiert (25402g, 15 min, 4 °C). Die Reinheit war durch die weiße Farbe erkennbar, und wurde mittels SDS-PAGE verifiziert. Durch die Zugabe von 20 mM DTT in den Waschpuffern ließ sich die Reinheit der *inclusion bodies* merkbar steigern. Die Ausbeute lag bei 0.3 g/L Zellkultur für nasse *inclusion bodies* und bis zu 150 – 200 mg/L gereinigtes Protein.

Aufschlusspuffer	W1	W2	W3
20 mM Tris/HCl; pH 8.0	50 mM Tris/HCl; pH 8.0	50 mM Tris/HCl; pH 8.0	50 mM Tris/HCl; pH 8.0
200 mM NaCl	100 mM NaCl	100 mM NaCl	100 mM NaCl
	10 mM EDTA	10 mM EDTA	-
	1 M Harnstoff	-	-
	2% Triton X-100	2% Triton X-100	-
	20 mM DTT	20 mM DTT	20 mM DTT

Tabelle 3.7: Puffer für die Aufreinigung von OmpF in Form von *inclusion bodies*

3.2.4. Reinigung von Reaktionsansätzen durch Entsalzungssäulen

Zur Vermeidung unerwünschter Nebenreaktionen mit überschüssigem Reagenz wurde bei der Cystein-Kupplungs-Reaktion oder der [3+2]-Click-Reaktion (im Falle der Reaktionen am eingeführten Iodacetamid-Alkin-Linker **18**) ein Reinigungsschritt mittels PD10-Entsalzungssäule durchgeführt. Zusätzlich wurde hierdurch auch ein Pufferwechsel durchgeführt, da z. B. die Rückfaltung als Folgeschritt bei einer anderen Pufferzusammensetzung durchgeführt wird. Hierzu wurde die Probe kurz zentrifugiert (12300g, 2 min, RT), um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Das Volumen wurde durch Verdünnen bzw. Konzentrieren (MWCO 10 kDa) auf 1.5 – 2.5 mL gebracht und bei RT auf die mit 25 mL Puffer vorequilibrierte Säule aufgetragen. Nachdem die Probe vollständig eingelaufen war, erfolgte die Elution mit 2.5 – 3.5 mL Puffer. Zur Wiederherstellung der ursprünglichen

Konzentration wurde die Probe auf das gewünschte Volumen aufkonzentriert (MWCO 10 kDa). Die Ausbeute betrug etwa 90% des eingesetzten Materials.

3.2.5. Dialyse von denaturiertem und nativem OmpF

Die Dialyse von OmpF-Proben wurde mittels Slide-A-Lyzer®-Mini-Dialyseeinheiten mit einem Probenvolumen von 50 – 200 µL durchgeführt. Hierbei konnte die entsprechende Probe entweder gegen eine harnstoffhaltige Lösung unter denaturierten Bedingungen oder gegen eine detergenzhaltige Lösung für native Bedingungen im Verhältnis 1:500 – 1:1000 bei RT dialysiert werden. Es wurde nach einer Zeit von etwa 3 – 4 h ein Pufferwechsel durchgeführt und nochmals für mindestens 4 Stunden dialysiert.

Ziel der Dialyse war zum einen die Abtrennung von überschüssigen Reaktanten und zum anderen die Änderung des pH-Wertes nach der Nativen Chemischen Ligation oder [3+2]-Click-Reaktionen (bei Reaktionen am Propargyltyrosinether **II**) für die entsprechenden Folgeschritte. Die Dialyse unter nativen Bedingungen erfolgte nach Aufkonzentrierungen der Proben zur Einstellung einer definierten Detergenzkonzentration, die für kristallographische Zwecke erforderlich war.

3.2.6. Rückfaltung von denaturiertem OmpF

Zur Rückfaltung von OmpF mittels Verdünnung in Vesikel-haltiger Lösung wurde ein literaturbekanntes Protokoll^[120, 121] mit kleinen Änderungen verwendet. Hierzu wurde zu Beginn eine Vesikelsuspension hergestellt, indem 10 mg DMPC in 300 µL Chloroform gelöst, das Lösungsmittel verdampft (35 °C, 300 mbar, 5 min) und für 1 h im Hochvakuum getrocknet wurde. Anschließend wurde zur Herstellung einer 7.4 mM Lösung 2 mL Rückfaltungspuffer hinzugegeben, und die milchig-trübe Suspension wurde bei 30 °C für 30 min im Ultraschallbad behandelt. Daraufhin wurde die Lösung über Nacht im Thermomixer inkubiert (30 °C, 400 rpm) und zu dieser 7.6 mg DDM ($c = 7.4 \text{ mM}$) gegeben. Abschließend erfolgte eine 10 minütige Behandlung im Ultraschallbad (30 °C) sowie eine weitere Inkubation im Thermomixer (30 °C, 3 h).

Zur Rückfaltung wurde denaturiertes OmpF, das in 6 bzw. 8 M Harnstoff solubilisiert war, einem Zentrifugationsschritt unterzogen (12300g, 2 min, RT). Hierbei wurden unlösliche Bestandteile entfernt, die bei der Rückfaltung stark störend wirkten. Die klare Lösung wurde nun rasch im Verhältnis 1:4 – 1:10 in eine auf 30 °C vorgewärmte Vesikel-Lösung gegeben,

sodass die Endkonzentration 20 – 100 μM betrug. Die Mixtur wurde über Nacht inkubiert (30 °C, 400 rpm) und die Rückfaltungsausbeute wurde mittels SDS-PAGE bestimmt.

Rückfaltungspuffer
40 mM Kalium-Phosphat; pH 7.3

Tabelle 3.8: Verwendeter Rückfaltungspuffer

3.2.7. Vorreinigung durch tryptischen Verdau

Bei den Proteinen der äußeren Membran mit β -Fass-Strukturmotiv kann die hohe Stabilität gegenüber Proteasen ausgenutzt werden, um eine Aufreinigung sowohl vom monomeren ungefalteten OmpF sowie von anderen weniger stabilen Proteinen zu erzielen. Hierzu wurde in den Rückfaltungsansatz die Serinprotease Trypsin in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$ gegeben und die Probe für 90 min bei 37 °C inkubiert. Zum Beenden des Verdaus wurde der Inhibitor TLCK im Überschuss hinzugegeben ($c = 25 \mu\text{M}$). Die Probe wurde im Anschluss je nach Verwendungszweck weiter aufgereinigt.

3.2.8. Reinigung durch Ionenaustauscherchromatographie (IEX)

Nach Rückfaltung und dem anschließenden tryptischen Verdau der Ansätze wurde zur Erzeugung größerer Mengen für Kristallisationsexperimente eine Ionenaustauscher-Chromatographie durchgeführt, bei der gleichzeitig ein Pufferwechsel für die Kristallisation durchgeführt wurde. Für eine effiziente Wechselwirkung der Proteinprobe mit der Säulenmatrix war es notwendig, die Probe vor dem Auftrag zu solubilisieren und die Phosphatpuffer-Konzentration zu erniedrigen. Hierzu wurde die Proteinlösung durch Zugabe von 1 - 3% octyl-POE (Endkonzentration) mit Wasser auf einen Phosphatgehalt von 10 mM verdünnt und die Lösung für mindestens eine Stunde bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Für die IEX wurden HiTrap DEAE-Sepharose FF-Säulen mit einem Volumen von 1 mL verwendet und die Probe durch einen linearen NaCl-Gradienten (0 – 0.5 M) eluiert. Üblicherweise wurde eine Flussgeschwindigkeit von 0.5 – 1.0 mL/min verwendet. Als Puffersubstanz wurde Tris verwendet, wenn das Protein kristallisiert werden sollte; alternativ wurde ein Phosphat-Puffer (z. B. für die CD-Spektroskopie) gemäß **Tab. 3.9** verwendet.

IEX-Puffer A1	IEX-Puffer B1	IEX-Puffer A2	IEX-Puffer B2
20 mM Tris/HCl; pH 8.0	20 mM Tris/HCl; pH 8.0	10 mM Na- Phosphat; pH 8.0	10 mM Na- Phosphat; pH 8.0
0.8% octyl-POE*	0.8% octyl-POE*	0.5% octyl-POE	0.5% octyl-POE
	500 mM NaCl		500 mM NaCl

*Für spätere Kristallisationszwecke wurde das Protein 1:1 verdünnt, die CMC von octyl-POE (0.23%)^[122] durfte hierbei nicht unterschritten werden.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der Puffer für die Ionenaustauscherchromatographie

3.2.9. Reinigung durch SDS-PAGE-Extraktion

Da die BLM-Methode auf die Messung von Einzelkanälen ausgelegt ist, wurden hierfür nur geringe Probenvolumina (1 – 2 μ L pro Messung, 200 – 300 μ L gesamt; $c = 1 - 5 \mu$ M) benötigt. Um eine vergleichbare Aufreinigung der nativen und hybriden OmpF-Spezies zu gewährleisten, wurde daher die Methode der SDS-PAGE-Extraktion angewandt. Hierbei wurde ein Gel, bei verdünnten Proben auch zwei Gele, unter maximaler Beladung mit der aufzureinigenden Spezies gefahren. Eine Spur dieser Probe sowie der Molmarker dienten als Schablone (siehe **Abb. 3.2**) und wurden mit Coomassie angefärbt.

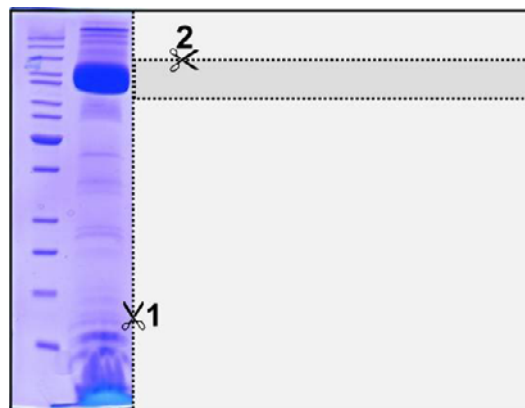


Abbildung 3.2: Extraktions-Schema

Anhand dieser Identifizierung konnte aus dem nicht-angefärbten Teil des Gels die gewünschte Bande ausgeschnitten werden. Alternativ wurden Proben, die aufgrund von Modifikationsreaktionen fluoreszierten, direkt auf dem UV-Schirm ausgeschnitten. Die zerkleinerten Gel-Stücke wurden für 16 h bei 20 °C in Extraktionspuffer inkubiert. Die Konzentration der Probe wurde mittels BCA-Assay bestimmt und die Probe gegebenenfalls aufkonzentriert. Die erhaltene Ausbeute betrug je nach ursprünglicher Konzentration der aufzureinigenden Probe 20 – 100 μ g.

Extraktionspuffer
40 mM Kalium-Phosphat; pH 7.3
0.5% octyl-POE

Tabelle 3.10: Zusammensetzung des Extraktionspuffers

3.2.10. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der rückgefalteten Proben (in octyl-POE solubilisiert) wurde mit Hilfe des BCA-Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei dieser colorimetrischen Methode wird Cu^{2+} durch die oxidierbaren Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan zu Cu^+ reduziert. Der sich mit der aromatischen Verbindung Bicinchoninsäure bildende violette Farbkomplex kann bei 562 nm detektiert werden, die Kalibration erfolgt gegen BSA.^[123]

Die Proteinkonzentration der denaturierten *inclusion bodies* wurde durch Absorption bei 280 nm in Puffer (6 M Guanidiniumchlorid, 20 mM Na-Phosphat; pH 6.5) bestimmt. Hierbei wurden die folgenden theoretischen Extinktionskoeffizienten^[124] verwendet:

OmpF / <i>inclusion bodies</i>	$\epsilon / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
OmpF-nativ	54210
OmpF- $\Delta(1-26)$ -N27C	49740
Cystein-Mutanten	54210

Tabelle 3.11: Theoretische ϵ -Werte, berechnet über den ExPASy-Server^[124]

3.3. Festphasen-Peptidsynthese (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS)

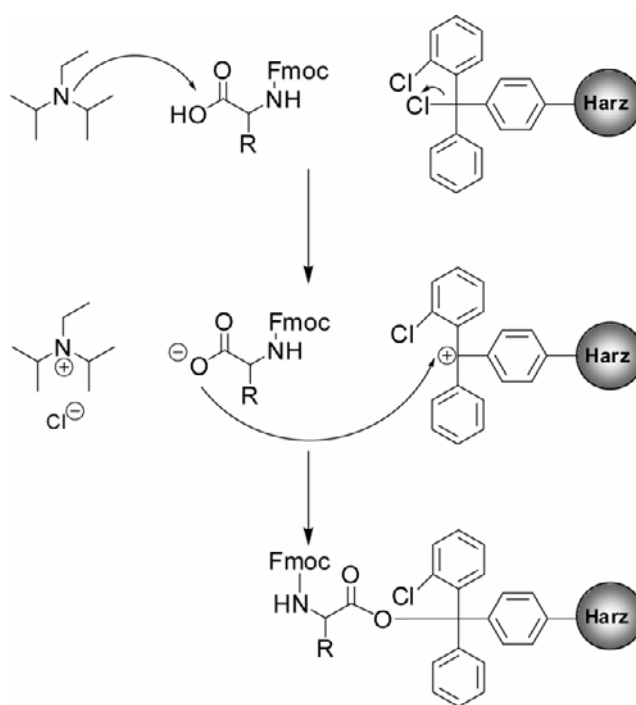
Im Jahr 1963 revolutionierte R. B. Merrifield die Peptidsynthese, indem er die Synthese an einem unlöslichen polymeren Trägermaterial, der sog. festen Phase, entwickelte.^[125] Bei diesem Prozess wird eine Aminosäure am C-Terminus über einen Linker an ein Harz gebunden. Durch die darauf folgenden Kupplungsschritte mit N-terminal geschützten Aminosäuren wächst die Peptidkette sukzessive; die unlöslichen und überschüssigen Reagenzien und Nebenprodukte können durch Filtration abgetrennt werden.

Die in dieser Arbeit hergestellten Peptide wurden durch die milde zweidimensionale orthogonale Fmoc / *t*Bu-Schutzgruppen-Strategie im *batch*-Verfahren hergestellt. Die Synthese erfolgte an einem vollautomatischen Peptidsynthesizer. Als Festphase diente ein quervernetztes Polystyren-Harz, das kovalent an einen 2-Chlorotriethylchlorid-Linker verknüpft war, was die Abspaltung unter sehr milden sauren Bedingungen erlaubte. Die Funktionalität der Aminosäure-Seitenfunktionen wurde durch säurelabile Schutzgruppen gewährleistet (Tert-Butyl (*t*Bu), Trityl (Trt) und Tert-Butyloxycarbonyl (Boc)).

3.3.1. Die einzelnen Reaktionsschritte der Peptidsynthese:

3.3.1.1. Initiation

Die Beladung des 2-Chlorotrityl-Harzes wurde mit dem Triethylammonium-Salz der gewünschten Fmoc-geschützten Aminosäure durchgeführt. Zur effizienten Beladung des Harzes, was wichtig für die Ausbeute des Gesamtproduktes ist, wurde dieses für 30 min in trockenem DCM gequollen und anschließend mit zwei Äquivalenten der Aminosäure sowie mit acht Äquivalenten *N,N*-Diisopropyl-ethylamin (DIPEA) umgesetzt. Die sterisch gehinderte Base ermöglicht die vollständige Deprotonierung der Carboxylgruppe der eingesetzten Aminosäure (**Schema 3.1**). Durch nukleophilen Angriff der deprotonierten Carboxylgruppe an die C-Cl-Bindung des 2-Chlorotritylchlorid-Harzes wird die Aminosäure am Harz verankert. Dieser Ansatz wurde für 2 h gerührt, das Lösungsmittel abfiltriert und das Harz wiederholt mit DCM gewaschen. Die freien Bindungsstellen des Harzes wurden anschließend mit Methanol abgesättigt, um verkürzte Peptidfragmente zu vermeiden.

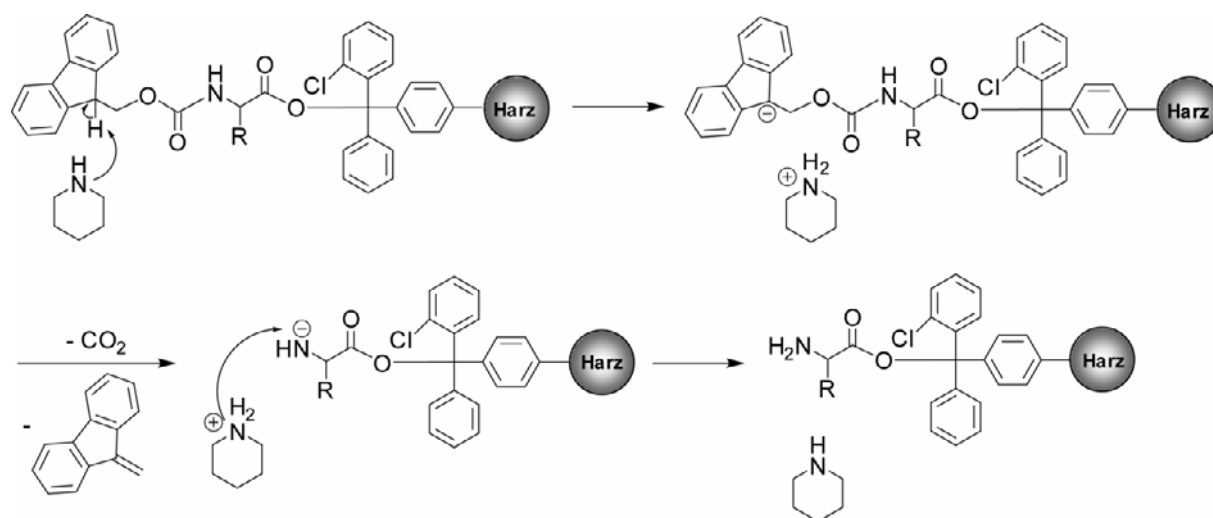


Schema 3.1: Die Initiation der Peptidsynthese

3.3.1.2. Elongation

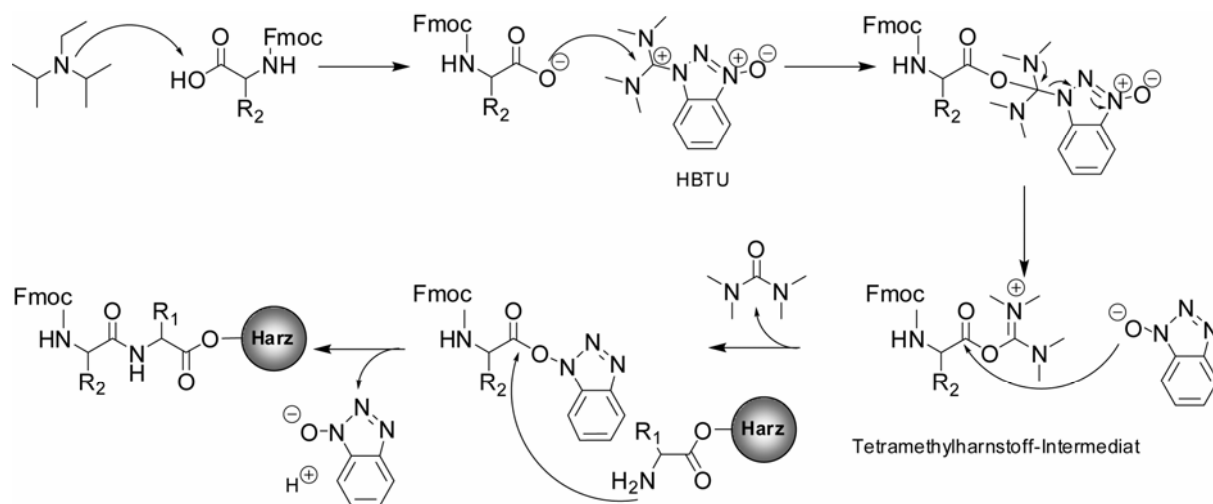
Die Verlängerung der Peptidkette erfolgte nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe durch eine 20-minütige Behandlung nach Zugabe von 15% Piperidin in DMF. Hierbei wird der Fluorenyl-Ring deprotoniert und es entsteht das resonanzstabilisierte

Fluorenyl-Carbanion. Daraufhin spalten sich Dibenzofulven und Kohlendioxid ab und die entschützte Kette verbleibt am Harz (**Schema 3.2**).



Schema 3.2: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Bevor es zur Peptidknüpfung zwischen der am Harz immobilisierten N-terminal entschützten Aminosäure und der hinzukommenden C-terminal zugänglichen Aminosäure kommt, muss letztere aktiviert werden. Dieses wurde durch die Zugabe des Kupplungsreagenzes HBTU und dem Additiv HOBt erreicht, die aktivierte Spezies bildet sich *in situ*. Die Carboxylgruppe der Aminosäure wird zu Beginn durch einen 10-fachen Überschuss DIPEA deprotoniert und greift anschließend nukleophil das elektrophile Carbenium-Ion des HBTUs an. Unter Austritt der Benzotriazolyl-Gruppe entsteht ein sehr reaktives Tetramethylharnstoff-Intermediat, welches wiederum nukleophil durch HOBt attackiert wird. Es bildet sich ein Benzotriazolyl-Ester, der die eigentliche aktive Spezies bei der Peptidbindungsbildung darstellt. Der freie N-Terminus des harzgebundenen Peptides verdrängt die Benzotriazolyl-Abgangsgruppe des Aktivesters, wodurch die Peptidkette um eine Aminosäure elongiert wird (**Schema 3.3**). Um quantitative Reaktionen zu garantieren, wurde ein dreifacher Überschuss der Fmoc-geschützten Aminosäure verwendet.



Schema 3.3: Aktivierung der Aminosäure am N-Terminus und Verlängerung des Peptids

3.3.1.3. Termination

Die Abspaltung des fertigen seitenkettengeschützten Peptids vom säurelabilen Chlorotritylchlorid-Harz gelingt durch Zugabe eines Abspaltgemisches aus AcOH/TFA/DCM (1:2:7). Das abgespaltene Peptid wurde durch Filtration vom Harz getrennt und anschließend mit n-Hexan ausgefällt. Das Lösungsmittelgemisch wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde erneut in n-Hexan/DCM gelöst und eingengt. Dieser Schritt wurde bis zu viermal wiederholt.

3.3.2. Reinigung und Peptidyl-Thioester-Kupplung der Peptide

Die Programmierung der Peptidsynthese und die Durchführung der Peptidyl-Thioester-Kupplung wurde in Kooperation mit Frau Dr. M. Cebi (Arbeitsgruppe Prof. Koert, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Ebenso wurde die Reinigung und Analytik der Peptide von Frau Dr. M. Cebi durchgeführt.

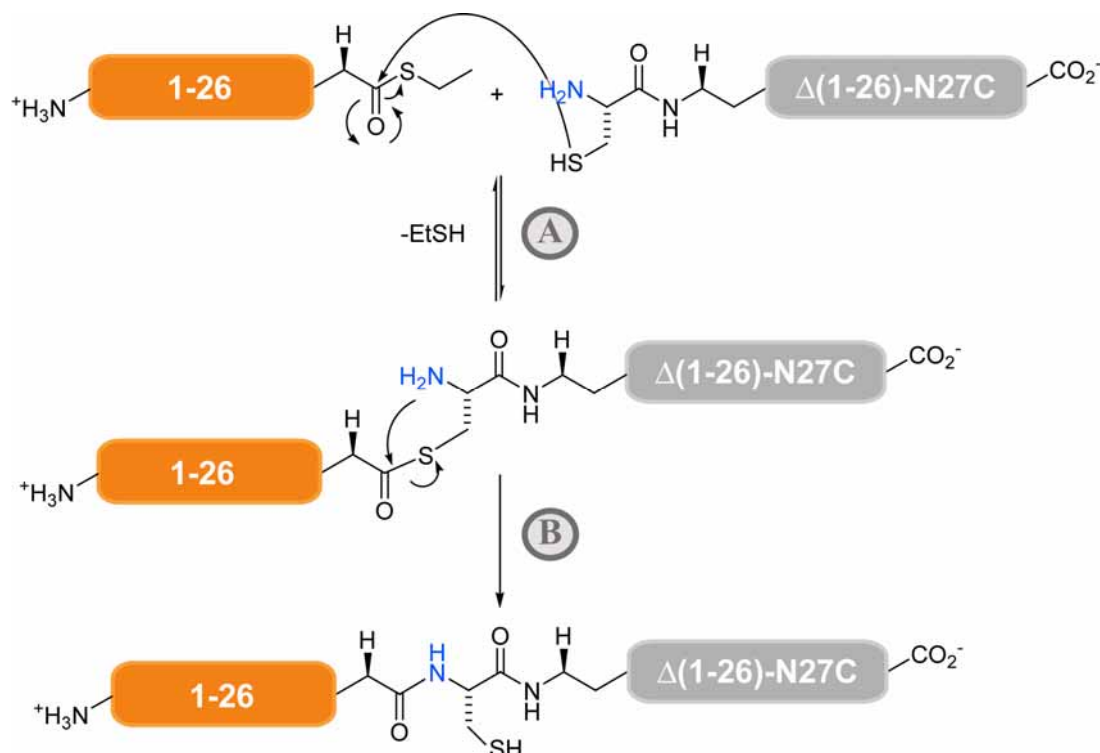
Das vom Harz freigesetzte und seitenkettengeschützte Peptid wurde im Anschluss an die SPPS säulenchromatographisch an Kieselgel mit CHCl₃/MeOH gereinigt. Die Reinheit der Peptide wurde mittels RP-HPLC überprüft, die Peptide wurden auf korrekte Masse mittels ESI-MS überprüft.

Im Anschluss an die SPPS musste das Carboxylende des Peptids in einen Thioester überführt werden, der für die Native Chemische Ligation obligat war (siehe Kapitel 3.4; 4.4). Hierzu wurde das Peptid anfangs in den reaktiven Thiophenolester überführt. Das Peptid wurde in

DCM gelöst und in Gegenwart von je zwei Äquivalenten HOBt/EDC mit zehn Äquivalenten Thiophenol versetzt. Nach 30 min wurde eine Spatelspitze K_2CO_3 zugegeben und die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Es zeigte sich, dass das Peptid **9** auf diese Weise gewonnen werden konnte; das Peptid **12** wurde jedoch bei der Entschützung wieder durch eine saure Esterspaltung in die freie Säure überführt. Das Problem wurde durch die Verwendung des weniger reaktiven Thioethylesters umgangen, der durch Zugabe von Ethanthiol in Gegenwart von HOBt/EDC erhalten wurde. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung erneut säulenchromatographisch aufgearbeitet. Das Lösungsmittel wurde durch einen Gefriertrockner im Hochvakuum schonend entfernt und das Peptid als weißer Feststoff erhalten.

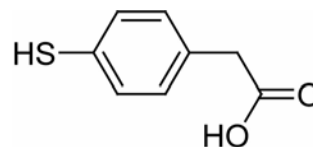
3.4. *Native Chemische Ligation (NCL)*

Ziel der NCL ist die Verknüpfung zweier Proteinfragmente über eine resultierende native Peptidbindung. Sie wurde von Kent *et al.* 1994 entwickelt^[126] und ist vielseitig einsetzbar. Bei der NCL werden die Proteinfragmente ohne zusätzliche Verwendung von Schutzgruppen unter schonenden Bedingungen wie z. B. Raumtemperatur, wässriges Milieu und einem neutralen pH-Bereich miteinander kombiniert. Hierbei werden auch chaotrope Salze wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid toleriert. Wird für die Kupplungsreaktion ein Fragment eingesetzt, das durch Genexpression rekombinanter DNA erzeugt wurde, spricht man von Expressed Protein Ligation (EPL). Bedingungen für die Reaktion ist ein als α -Thioester vorliegender C-terminaler Rest, der im Idealfall sterisch unanspruchsvoll ist (wie Glycin), sowie ein N-terminales Cystein. Durch die Zugabe von Thiolen wird durch eine erste Transesterifizierung die Reaktivität des α -Thioesters verstärkt, sodass die Reaktion mit höheren Ausbeuten verläuft.^[127] In einem ersten reversiblen Schritt (**Schema 3.4**, Schritt A) kommt es durch eine Transthioesterifizierung zwischen dem C-terminalen Thioester und dem Cysteinrest zu einem Thioester-verknüpften Intermediat. Im zweiten irreversiblen, schnellen und spontan ablaufenden Reaktionsschritt (**Schema 3.4**, Schritt B) findet ein S-N-Acyltransfer mit der α -Aminogruppe des Cysteins statt, hierbei wird die native Amidbindung ausgebildet.



Schema 3.4: Reaktionsschritte der NCL am Beispiel von OmpF

Bei den zugesetzten Thiolen handelt es sich meist um Thiophenol / Benzylmercaptam-Gemische (je 2% oder 4%)^[128, 129] oder um das Alkanthiol MESNA. Eine Studie, bei der die katalytische Aktivität verschiedener Thiole systematisch getestet wurde, ergab, dass durch den Einsatz von MPAA wesentlich bessere Ausbeuten in kürzerer Zeit erhalten werden können.^[130] Als weitere Vorteile sind die gute Löslichkeit, der angenehmere Geruch sowie die Ungiftigkeit der Verbindung im Vergleich zu Thiophenol zu nennen.



MPAA

Molekulargewicht: 168.2 g/mol

Um eine Modifikation der OmpF-Pore zu erreichen, wurde OmpF in zwei Fragmente geteilt, die dann durch NCL miteinander verknüpft wurden. Dabei wurde der „Schnitt“ zwischen den Aminosäuren 26 und 27 durchgeführt und das kürzere Fragment per Festphasensynthese dargestellt (siehe Kapitel 4.1). Nach anfänglichen Problemen bei der Aufreinigung des Peptides wurde der C-terminale Thiophenolester des Peptides gegen einen Ethylthioester ausgetauscht. Bei der SPPS wurde das Peptid der nativen und modifizierten Sequenz entsprechend synthetisiert.

Das homolog exprimierte 314-aa-lange C-terminale Fragment wurde als Asn27Cys-Mutante erzeugt. Durch N-terminale Edman-Sequenzierung konnte eine quantitative Abspaltung des

N-terminalen Formylmethionins durch die endogene *E. coli* Aminopeptidase belegt werden.^[114]

Ursprünglich wurde MESNA als Thiol bei der Reaktion zugesetzt; aus o. g. Gründen wurde es gegen den besseren Katalysator MPAA ausgetauscht. **Tab. 3.12** gibt einen typischen Reaktionsansatz wieder. Nach Zusammenfügen aller Reaktionskomponenten wurde der pH-Wert falls nötig mit NaOH eingestellt. Die Reaktion wurde bei verschiedenen Temperaturen, Konzentrationen und Reaktionszeiten getestet, die Ergebnisse sind in Kap. 4.4 zusammengefasst. Die Auswertung der Reaktion erfolgte durch densitometrische Analyse mithilfe des *open-source* Programms *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

NCL-Puffer
8 M Harnstoff
100 mM Na-Phosphat; pH 7.3

Reaktionsansatz für die Native Chemische Ligation			
	Stock-Konzentration	Endkonzentration	Equivalente
OmpF-Δ(1-26)N27C	#	1 mM	1
OmpF-(1-26)	*	2 mM	2
TCEP	500 mM	50 mM	50
MPAA [§]	30 mM	10 mM	10

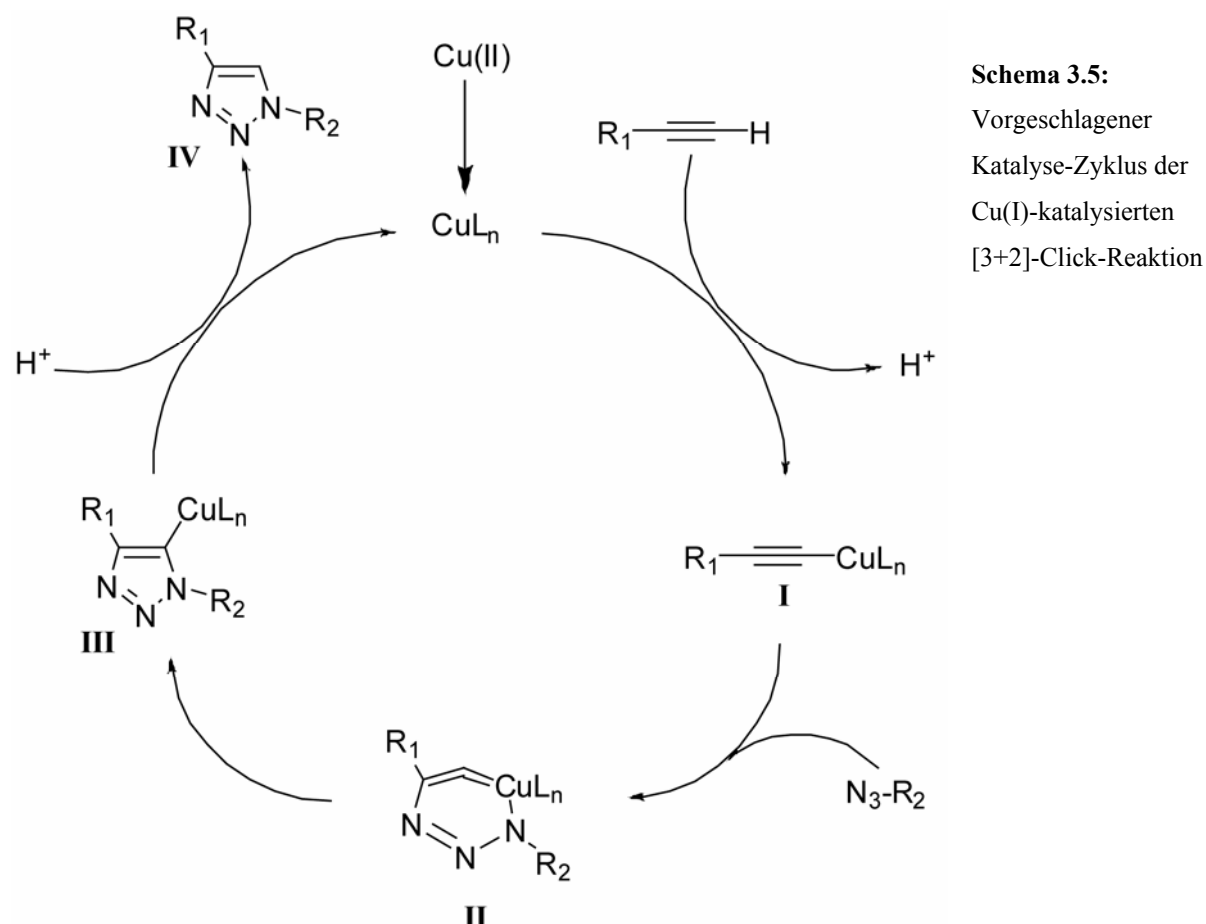
als Suspension vorliegend | * als Feststoff eingewogen | § in NCL-Puffer gelöst

Tabelle 3.12: NCL-Puffer und typischer Reaktionsansatz

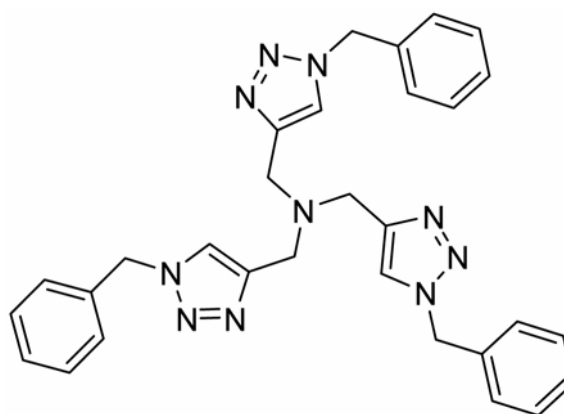
3.5. [3+2]-Click-Reaktion

Die [3+2]-Click-Reaktion,^[131] oder auch [1,3]-Dipolare-Cycloaddition/Huisgen-Reaktion,^[132] läuft unter sehr milden Reaktionsbedingungen ab. Dazu zählt der Ablauf in wässriger Umgebung, bei neutralen pH-Werten oder bei Raumtemperatur. Bei dieser Reaktion werden zwei Moleküle, von denen eines eine Azid-Gruppe und das zweite eine funktionelle Alkin-Gruppe trägt, unter Ausbildung eines Fünfringsystems miteinander verknüpft. Durch die Zugabe von Cu(I) (oder die Erzeugung von Cu(I) aus Cu(II) *in situ*) wird regioselektiv das 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazol gebildet.^[133] Für die Verknüpfungsreaktion müssen die eingesetzten Moleküle nicht geschützt vorliegen und Nebenreaktionen werden weitestgehend vermieden, was die Anwendung in der Proteinchemie ermöglicht.^[134, 135] Diese Methode

findet zahlreiche weitere Anwendungen in der Chemie.^[136] Als möglicher Katalysezyklus wurde folgender vorgeschlagen (**Schema 3.5**).^[133]



Der Katalysezyklus beginnt mit der Bildung eines Kupfer(I)-Acetylids **I**. Berechnungen zeigten, dass anstelle eines konzertierten ein schrittweise entstehender Übergangszustand bevorzugt ist, bei dem eine sechsgliedrige Kupfer-enhaltende Zwischenstufe entsteht (**II**). Nach einer Umlagerung in die Zwischenstufe **III** kommt es zur Abspaltung des Cu(I)-Ligand-Komplexes und zur Freisetzung des 1,4-Produktes (**IV**).



TBTA

Molekulargewicht: 530.3 g/mol

In der vorliegenden Arbeit wurde als Ligand TBTA verwendet. Zur Erzeugung der Cu(I)-Spezies wurde Cu(II)SO₄ durch Natriumascorbat oder TCEP *in situ* reduziert. Ein typischer Reaktionsansatz für die [3+2]-Click-Reaktion ist in **Tab. 3.13** wiedergegeben. Die

Alkinfunktionalität wurde entweder durch den in das Peptid **12** inkorporierten Propargyl-tyrosinether-Baustein **II** oder durch den Iodacetamid-Alkin-Baustein **18**, gekoppelt durch S-Alkylierung an die Cysteinmutanten, eingeführt. Die Reaktionsansätze mit einem Volumen von 0.1 – 1 mL wurden im Thermomixer inkubiert (25 °C, 90 min, 400 rpm) und anschließend EDTA im 2.5fachen Überschuss relativ zu der Kupfer-Konzentration zugegeben. Die Negativkontrolle beinhaltete anstelle von Kupfer EDTA in einer vergleichbaren Konzentration. Die Ansätze wurden direkt mittels Entsalzungssäulen oder durch Dialyse von überschüssigen Reaktanten befreit (siehe Kapitel 3.2.4 und 3.2.5); alternativ wurden die Ansätze bei -20 °C bis zur Aufarbeitung gelagert.

Die Analytik der Reaktion erfolgte quantitativ durch HPLC-MS (siehe folgender Abschnitt) oder konnte qualitativ mittels SDS-PAGE auf dem UV-Schirm dokumentiert werden, da fluoreszierende Azide eingesetzt wurden.

Click-Puffer
6 M Harnstoff
100 mM Na-Phosphat; pH 8.0

Reaktionsansatz für die [3+2]-Click-Chemie			
	Stock-Konzentration	Endkonzentration	Equivalente
OmpF-K16C- 18 / NCL-Produkt 23 [§]	300 µM / 1 mM	150 µM / 500 µM	1
Azid-Verbindung*	50 / 100 mM	1.5 mM / 5 mM	10
TCEP	100 mM	1.5 mM / 5 mM	10
<i>Probe für 3 sec vortexiert</i>			
TBTA [#]	2 mM	150 µM / 200 µM [§]	1 / 0.4
Cu(II)SO ₄	50 mM	1.5 mM / 5 mM	10
<i>Probe für 3 sec vortexiert</i>			

[§]Endkonzentration Harnstoff nach Verdünnung in Harnstoff-freiem-Click-Puffer: 3 M | gelöst in: *MeCN,

[#]DMSO:[†]BuOH 1:4 | [§]Maximal verwendete Endkonzentration (1:10 Verdünnung) aufgrund der schlechten Löslichkeit der Verbindung

Tabelle 3.13: Zusammensetzung des Click-Puffers sowie eines typischen Reaktionsansatzes der [3+2]-Click-Reaktion

3.6. S-Alkylierung an Cystein-Reste durch synthetische Modulatoren

Es gibt verschiedene Methoden, Proteine mit Verbindungen zu modifizieren, die über reaktive funktionelle Gruppen verfügen. Neben den aminreaktiven Isothiocyanaten oder Succinimidylester-Gruppen gibt es verschiedene Gruppen, die selektiv mit Thiolen reagieren. Dazu zählen Maleimide, benzyliche Säurehalogenide, Brommethylketone oder das Iodacetamid. Die Verwendung dieser Substanzen findet breite Anwendung in der Erforschung von z. B. Protein-Protein/Ligand-Interaktionen, bei konformationellen Untersuchungen durch Fluoreszenz-Spektroskopie (FRET-Effekt) oder durch funktionelle Untersuchungen mittels BLM.^[137] In der vorliegenden Arbeit wurden Iodacetamidhaltige Reporterverbindungen verwendet, um diese selektiv und kovalent mit Thiolen zu verknüpfen.

Die in Harnstoff solubilisierten *inclusion bodies* der Cystein-Mutanten von OmpF wurden mit TCEP versetzt (siehe **Tab. 3.14**) und für 10 min bei 37 °C und 400 rpm im Thermomixer inkubiert, um die Thiol-Gruppen vollständig zu reduzieren. Anschließend wurde die entsprechende Iodacetamid-Verbindung im 10-fachen Überschuss zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 45 min wurden erneut TCEP und die Iodacetamid-Verbindung zugegeben. Nach Ablauf von 90 min wurde die Reaktion durch Zugabe von überschüssigem DTT (5 mM) gestoppt und der Reaktionsansatz direkt über eine Entsalzungssäule aufgearbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

S-Alkylierungspuffer

6 M Harnstoff

100 mM Na-Phosphat; pH 7.5

Reaktionsansatz für die S-Alkylierung

	Stock-Konzentration	Endkonzentration	Äquivalente
OmpF-Cysteinmutante	-	0.2 mM	1
TCEP	100 mM	2 mM	10
Iodacetamid-Verbindung*	100 mM	2 mM	10

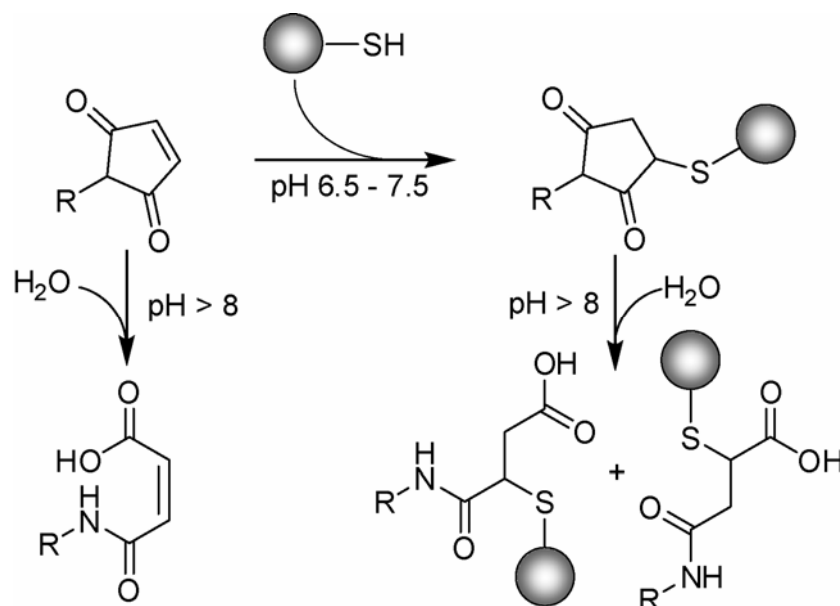
*in MeCN gelöst

Tabelle 3.14: Zusammensetzung des verwendeten Puffers sowie eines typischen Reaktionsansatzes der S-Alkylierungs-Reaktion

3.7. 2-Punkt-Anknüpfungsreaktionen an Cystein-Doppelmutanten

Für eine 2-Punkt-Anknüpfung wurde das homobifunktionelle Bis-Maleimid 1,11-Bismaleimidtriethylenglykol verwendet, das eine Länge von 17.8 Å aufweist. Maleimide reagieren bei einem pH-Wert von 6.5 – 7.5 selektiv mit Thiol-Gruppen unter Bildung eines stabilen Thioethers. Bei pH 7 ist die Reaktivität der Maleimide um drei Größenordnungen höher für Thiole als für Amine. Bei einem pH > 7.5 verschiebt sich die Reaktivität zugunsten primärer Amine und das Maleimid kann hydrolysieren (**Schema 3.6**). Das hier verwendete Crosslinking-Reagenz wurde in wässriger Lösung immer frisch vor einer Reaktion angesetzt und aufgebraucht, um Hydrolyse zu vermeiden.

Die zurückgefalteten Cystein-Mutanten wurden nach dem tryptischen Verdau des Monomers mit TCEP versetzt und nach einer 30-minütigen prä-Inkubation bei 25 °C der Crosslinker BM(PEG)₃ zugegeben. Die Reaktion wurde nach 3 h bzw. nach 16 h durch Zugabe von 2 mM DTT gestoppt. Vorher wurde ein Teil der Lösung entnommen und erneut TCEP und das Dansyl-Iodacetamid **19**, beides in zehnfachem Überschuss, zugegeben. Die Reaktion wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert und durch die Zugabe von 5 mM DTT gestoppt. Zur Vermeidung von Schwefel-Reoxidation durch zweiwertige Metallatome wurde entsprechend den Herstellerangaben EDTA zugesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz ist in **Tab. 3.15** wiedergegeben.



Schema 3.6: Reaktion von Thiolen mit Maleimiden und gezeigte Hydrolyseprodukte.

Puffer für 2-Punkt-Anknüpfung

50 mM NaCl

100 mM Na-Phosphat; pH 7.0

Reaktionsansatz für die 2-Punkt-Anknüpfung			
	Stock-Konzentration	End-Konzentration	Equivalente
OmpF-	100 μ M in		
Cysteinmutante	Rückfaltungspuffer	50 μ M	1
TCEP	50 mM	250 μ M	5
EDTA	50 mM; pH 7.0	250 μ M	5
<i>Probe vortexiert und für 30 min prä-inkubiert</i>			
BM(PEG) ₃ *	10 mM	0.5 mM	10

* in H₂O gelöst, Lösung durch Ultraschall behandelt

Tabelle 3.15: Zusammensetzung des verwendeten Puffers sowie eines typischen Reaktionsansatzes der 2-Punkt-Anknüpfungsreaktion

3.8. CD-Spektroskopie

Die Grundlage der CD-Spektroskopie ist die Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit Materie. Dabei können zwei verschiedene Effekte auftreten. Wird die linear polarisierte Welle beim Durchlaufen des Mediums wellenlängenabhängig in ihrer Polarisationsrichtung gedreht, spricht man von optischer Rotationsdispersion (ORD). Werden die beiden zirkular polarisierten Komponenten, aus denen eine linear polarisierte Welle zusammengesetzt ist, zusätzlich verschieden stark absorbiert, so liegt Circular dichroismus (CD) vor. Voraussetzung für das Auftreten von CD und ORD ist Chiralität des betreffenden Moleküls. Dies kann durch die Struktur des Moleküls, aber auch durch seine räumliche Anordnung gegeben sein. Zusätzliche Bedingung für CD ist die Fähigkeit des Moleküls, Licht zu absorbieren. Die eigentliche Messgröße beim CD ist der Unterschied der Extinktionskoeffizienten für links bzw. rechts polarisiertes Licht (aus historischen Gründen wird der Begriff der Elliptizität verwendet). Diese Methode ist bei der Bestimmung von Sekundärstrukturen von Proteinen hilfreich, weil die Sekundärstrukturen α -Helix, β -Faltblatt, sowie *Random-Coil*-Strukturen gut unterschieden werden können, da jede Struktur ein spezifisches Spektrum besitzt. Weiterhin können Schmelzkurven aufgenommen werden, hierbei wird bei einer definierten Wellenlänge die Elliptizität über einen Temperaturbereich gemessen.^[138, 139]

Der Dichroismus wurde in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 mm bei einer Temperatur von 20 °C im Nah/Fern-UV-Bereich von 200 – 260 nm aufgenommen. Die Spektren wurden gegen den verwendeten Puffer als Basis gemessen. Jede Messung wurde dreimal wiederholt und akkumuliert. Die Scangeschwindigkeit betrug 50 nm/min, alle 0.1 nm wurde ein Messpunkt aufgenommen. Zur Aufnahme der Schmelzkurven wurde die Probe von 20 bis 95 °C erhitzt und wieder abgekühlt, dabei betrug die Änderungsrate 2 °C/min und wurde bei 216 nm detektiert.

Die erhaltenen Absorptionswerte in *mdeg* wurden nach folgender Formel in die mittlere molare Elliptizität umgewandelt:

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta}{c \cdot d \cdot N_{AS} \cdot 10} \left[\frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right]$$

$[\Theta]_{MRW}$	mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$
Θ	gemessene Elliptizität in <i>mdeg</i>
c	Proteinkonzentration in M
d	Schichtdicke in cm
N_{AS}	Anzahl der Aminosäurereste des Proteins

3.9. Funktionelle Charakterisierung durch Black Lipid Membrane-Messungen (BLM)

Die funktionelle Charakterisierung von OmpF und den in dieser Arbeit erzeugten hybriden OmpF-Molekülen erfolgte durch die BLM-Methode (Abb. 3.3 zeigt einen schematischen Aufbau der Messanordnung). Hierbei wurde eine künstliche Lipid-Doppelschicht in einer kleinen Öffnung (hier: 200 μm) einer Polystyrol-Kammer

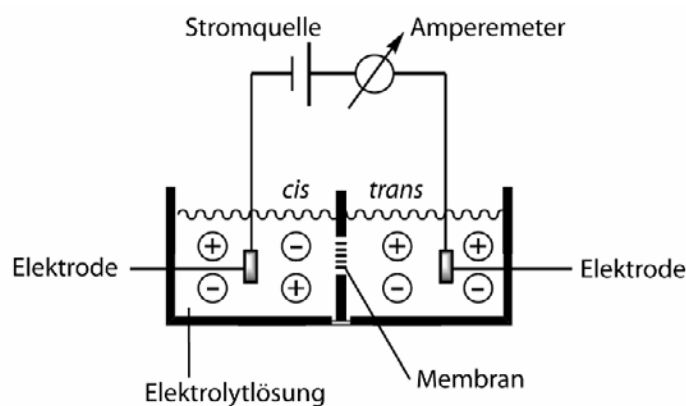


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau einer BLM-Messanordnung.

erzeugt. Diese Kammer wurde in die Messeinheit eingeführt, die aus zwei Hälften besteht: die

cis- und die *trans*-Kammer. Beide wurden mit 2.5 ml Pufferlösung befüllt (150 mM KCl, 5 mM HEPES; pH 7.2). Das Lipid bestand aus einer 4:1 Mischung von L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylethanolamin, die als Stocklösungen (25 mg/mL) in *n*-Dekan vorlagen. Nach Zugabe von 1 μ L Lipid in die Pufferlösung wurde die Membran nach der „*painting*“-Methode durch Auf- und Abpipettieren der Lösung gebildet. Von der Proteinlösung, die in einer Konzentration von 1 – 5 μ M vorlag, wurde 1 μ L (0.04 – 0.2 μ g) in die *trans*-Seite der Apparatur gegeben. Die gewünschte Spannung wurde angelegt und die Messung gestartet. Die Aufzeichnung der Stromstärke erfolgte durch einen *patch-clamp amplifier* mittels der dazugehörigen pClamp 9-Software.

In regelmäßigen Abständen wurden erneut Lipid und Protein in o. g. Mengen zugegeben, da das Protein in der Lösung ausfiel oder an der Wand der Messkammer anhaftete. Nach einer neuen Zugabe von Protein konnte ein relativ schneller Einbau des Proteins in die Membran beobachtet werden (etwa 1 – 3 min). Nach mehrmaliger Erneuerung der Membran hingegen verlängerte sich die Einbaudauer (3 – 7 min), die zudem auch von der zugesetzten Konzentration und Beschaffenheit der Probe abhängig war.

Für die Aufnahme von I/U-Kurven wurden bei der betreffenden Spannung Kanalereignisse ausgewertet, die auf der Schließung eines Trimers über die Monomerstufen beruhten. Zusätzlich wurden Ereignisse ausgewertet, bei dem ein Trimer eine konzertierte Öffnung und Schließung zeigte. Für jeden Spannungswert (± 160 mV bis ± 60 mV, in 20 mV-Schritten) wurden mindesten drei unabhängige Kanalereignisse ausgewertet, in den meisten Fällen konnten jedoch deutlich mehr Messungen ausgewertet werden. Aus den erhaltenen Werten wurde die Standardabweichung für jeden Spannungswert berechnet. Die minimale bzw. maximale Leitfähigkeit wurde durch Regression von jeweils vier minimalen bzw. maximalen Messpunkten pro Spannungswert ermittelt.

3.10. Proteinkristallisation und Strukturbestimmung

3.10.1. Probenvorbereitung

Die für die Kristallisation vorgesehenen Proteinlösungen wurden nach der Aufreinigung auf eine geeignete Konzentration (8 bis 10 mg/mL) aufkonzentriert. Anschließend wurde ein Dialyseschritt zur Einstellung der Detergenzkonzentration durchgeführt. Hierbei wurden bei kleinen Volumina (100 – 500 μ L) Slide-A-Lyzer-Mini-Dialyseeinheiten verwendet, bei größeren Volumina (0.5 – 3 mL) Slide-A-Lyzer-Dialysekassetten. Der MWCO der Membran betrug 10 kDa. Die Dialyse gegen den gewünschten Puffer erfolgte bei RT in einem

Verhältnis von 1:150 bis 1:1000 unter vorsichtigem Rühren der Lösung; nach zwei bis vier Stunden wurde ein Pufferwechsel durchgeführt, und die Probe für mehrere Stunden oder über Nacht weiter dialysiert.

Alle Proteinlösungen wurden direkt vor der Kristallisation mittels Ultrafree-MC Sterilfiltereinheit (0.22 µm) partikelfrei filtriert. Ebenso wurden alle für die Kristallisation verwendeten Lösungen steril filtriert (0.20 µm).

3.10.2. Kristallisation durch *sitting-drop*

Generell beruht die Kristallisation von Proteinen durch Dampfphasendiffusion darauf, dass eine Proteinlösung mit einer Präzipitanzlösung verdünnt wird. Da sich diese Lösung in einem geschlossenen System über einem Reservoir der unverdünnten Präzipitanzlösung befindet, kommt es bis zum Erreichen eines Equilibriums zu einem Verdampfen von Wasser. Dabei wird die Proteinkonzentration sukzessive erhöht, und im Idealfall bilden sich wenige Nukleationskeime, die zur Bildung von Einkristallen führen.

Die *sitting-drop*-Variante der Dampfphasendiffusion wurde mit Hilfe eines Pipettierroboters im 96-*well*-Maßstab durchgeführt. Die verwendeten Platten verfügten über zwei bzw. drei Vertiefungen für den Kristallisationsansatz pro Bedingung. Für das *Screening* von neuen Kristallisationsbedingungen des nativen OmpF sowie der hybriden OmpF-K16C-17 Verbindung wurden sog. *sparse matrix screens* verwendet.^[140]

Die auspipettierte Tropfengröße betrug 300 nL Proteinlösung + 300 nL Präzipitanzlösung. Sämtliche Kristallisationsplatten wurden bei konstanten 18 °C gelagert und in regelmäßigen Zeitabständen unter dem Mikroskop oder mittels Dokumentationssystem kontrolliert.

3.10.3. Kristallisation durch Mikrodialyse

Bei der Methode der Mikrodialyse handelt es sich um eine Variation der Dampfphasendiffusion. Die Proteinlösung ist hierbei durch eine semipermeable Membran von der Präzipitanzlösung getrennt, die für Moleküle kleiner des *Cut Offs* der Membran wie Ionen und Puffermoleküle passierbar ist (**Abb. 3.4**). Die Equilibriumskinetik ist u. a. abhängig von den gegebenen Parametern wie dem *Cut Off* der Membran, der Temperatur, Art des Präzipitanzmittels, den eingesetzten Volumina und der Konzentration der einzelnen Komponenten. Prinzipiell wird ein Gleichgewichtszustand schneller erreicht als bei der *sitting-drop*-Methode. Ein Vorteil dieser Methode besteht in der Möglichkeit, die Präzipitanzkonzentration schrittweise zu erhöhen, indem die Dialyseeinheit in ein neues *Well*

überführt wird. Die Nachteile dieser Methode sind die großen benötigten Probenvolumina, die schlechte Handhabung bei dem Verschließen der Proteinlösung mit der Membran und die Extraktion der Kristalle.

Für die Kristallisation von OmpF wurden Mikrodialyse-Einheiten mit einem

Probenvolumen von 5 μL sowie VDX-Kristallisationsplatten verwendet; in das Reservoir wurden je 1.5 mL Lösung eingefüllt. Die verwendete Membran hatte einen MWCO von 6 – 8 kDa und wurde vor Beginn der Kristallisation in Wasser eingeweicht.

Die Kristallisationsansätze wurden bei konstanten 18 °C gelagert und in regelmäßigen Zeitabständen unter dem Mikroskop kontrolliert.

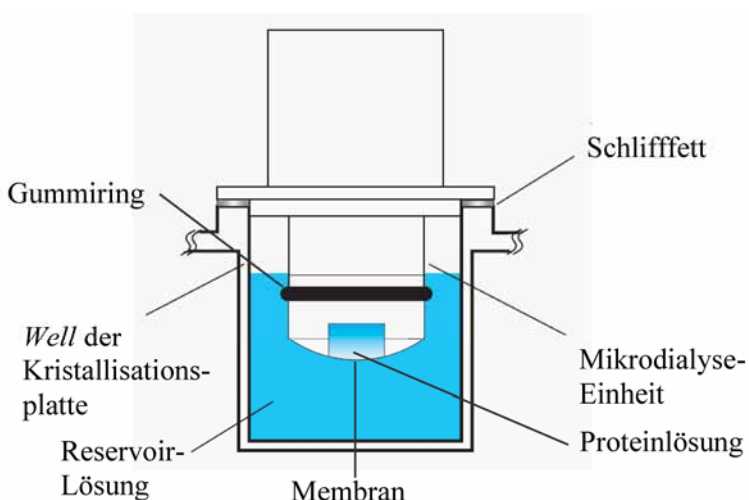


Abbildung 3.4: Schema einer Mikrodialyse-Kristallisation
(Quelle: www.hamptonresearch.com)

3.10.4. Cryopuffer-Test an der Kupferdrahanode-Röntgenquelle

Die potentiellen Cryopuffer, die ein Ausbilden von Eis beim Einfrieren der Kristalle in flüssigem Stickstoff verhindern sollten, wurden vor Verwendung an der *Inhouse*-Kupferdrahanode durch zweiminütige Belichtung mit Röntgenstrahlung und Aufnahme eines Beugungsbildes auf Diffraktion und typische Eisringe (1.9 Å, 2.5 Å, 3.66 Å) getestet.

3.10.5. Datensammlung und Datenreduktion

Die Datensammlung der hybriden OmpF-Kristalle wurde am *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in Grenoble an der Beamline ID29 durchgeführt. Die Belichtungszeit der einzelnen Aufnahmen betrug 0.5 s, die Kristalle oszilierten während der Aufnahme um 0.3 bzw. 0.5 °. Die Integration der Daten erfolgte mit dem Programm XDS, die Datenreduktion wurde mit dem Programm XSCALE durchgeführt.^[141]

3.10.6. Modellbau und Strukturverfeinerung

Das in der Kristallographie vorherrschende Phasenproblem wurde im vorliegenden Fall durch *molecular replacement* mittels PHASER^[142] gelöst. Hierbei wurden die in der PDB erhältlichen OmpF-Koordinaten (PDB-Code: 2OMF) verwendet. Die Struktur wurde mittels COOT^[143] und REFMAC^[144] weiter verfeinert. Eine qualitative Beurteilung der verfeinerten Struktur liefert der kristallographische R-Faktor. Dieser beschreibt die relative Diskrepanz zwischen den experimentell bestimmten Strukturfaktoramplituden (F_{obs}) und den berechneten Strukturfaktoramplituden aus der Modellstruktur (F_{calc}). Für die Modellberechnung und Verfeinerung der Struktur werden rund 95% der Daten verwendet, aus den restlichen rund 5% der Daten wird der freie R-Faktor gebildet. Der Arbeits-R-Faktor berechnet sich nach folgender Formel:

$$R_{\text{work}} = \frac{\Sigma(F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})}{\Sigma(F_{\text{obs}})}$$

3.10.7. Graphische Darstellung

Sämtliche Abbildungen von Proteinstrukturen und der Oberflächen wurden mit dem Programm PyMOL^[145] erstellt. Das Kronenether-Molekül wurde mit dem in der CCP4-Suite integrierten Programm Sketcher^[142] erstellt. Für die schematischen Formeldarstellungen wurde das Programm ChemDraw (Cambridge Soft) verwendet.

3.11. Massenspektrometrische Analytik

Die Analytik der Proteinproben sowie die Optimierung der aufgeführten Methode wurde von Dr. U. Linne in der massenspektrometrischen Abteilung des Fachbereichs Chemie, Philipps-Universität Marburg, durchgeführt.

Für eine qualitative sowie als auch quantitative Bestimmung einzelner Massenfragmente mittels massenspektrometrischer Analytik (HPLC-MS) wurden 1-3 mg denaturiertes Protein aus harnstoffhaltiger Lösung mit Wasser gefällt (1:7 – 1:10). Die Lösung wurde vortexiert und zentrifugiert (12300g, 30 min, 4 °C). Das zum Teil sichtbare weiße Pellet wurde zweimal erneut mit Wasser resuspendiert und zentrifugiert (12300g, 30 min, 4 °C), um Reste von Harnstoff zu entfernen. Das Pellet wurde mit 90 µL 10% Acetonitril/Trypsin-Puffer (50 mM (NH₄)₂CO₃; pH 8.0) versetzt und für eine Minute auf 95 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Probe

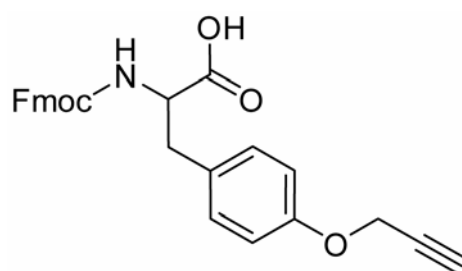
wurden 10 μL einer Trypsin-haltigen Lösung (entsprechend 10 μg Trypsin) zugegeben und die Probe über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die HPLC-MS-Analyse wurde an einem Agilent 1100 HPLC System, an das ein Finnigan LTQ-FT Massenspektrometer gekoppelt war, gemessen. Die Proben wurden bei 40 °C und einer Flussrate von 0.2 mL/min über eine 125/2 Nucleodur C18ec Säule aufgetrennt (Macherey-Nagel). Der lineare Gradient (Laufmittel A: Wasser, 0.05% Ameisensäure; B: Acetonitril, 0.045% Ameisensäure) war wie folgt: Puffer B wurde linear von 5% auf 50% in 60 min und schließlich in weiteren 15 min auf 95% erhöht. Zur Ionisation wurde ESI-MS verwendet und ein Massenbereich von 600-1100 m/z wurde über FTMS mit hoher Auflösung und Genauigkeit detektiert. Parallel konnten vier verschiedene Fragmente in einer linearen Ionenfalle für die MSMS basierte Sequenzanalyse isoliert und fragmentiert werden, was das Signal/Rausch-Verhältnis verbesserte sowie die Bestimmung modifizierter Aminosäuren ermöglichte. Nach der Analyse der Fragmente konnte eine Integration der entsprechenden Peaks im UV-Spektrum oder im TIC zur Bestimmung des Edukt/Produkt-Verhältnisses durchgeführt werden.

4 Ergebnisse

4.1. Synthese der Peptid-Bausteine für die Native Chemische Ligation

Der nicht-natürliche und Fmoc-geschützte Aminosäurebaustein Propargyltyrosinether **II** wurde im Rahmen einer Kooperation (Arbeitsgruppe Prof. Koert, Philipps-Universität Marburg) von Frau Dr. M. Cebi synthetisiert.^[146] Dieser wurde bei der Festphasensynthese an Position 16 anstatt der Aminosäure Lysin eingesetzt und somit eine neue Funktionalität in die OmpF-Pore eingeführt. **Tab. 4.1** zeigt eine Übersicht über die primäre Aminosäuresequenz der Peptide. Eine Formelzeichnung ist in **Abb. 4.2** für das geschützte und ungeschützte Peptid gezeigt. Eine komplette Übersicht über die synthetisierten Peptide sowie die dazugehörige Analytik per HPLC und Massenspektrometrie gibt **Tab. 4.2** wieder. Die HPLC-Analytik wurde von Frau Dr. M. Cebi durchgeführt.^[146]



II

N-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*O*-propargyl-L-Tyrosin

Molekulargewicht: 441.5 g/mol

AA-Sequenz der synthetisierten Peptide															
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A	E	I	Y	N	K	D	G	N	K	V	D	L	Y	G	K/II
17	18	19	20	21	22	23	24	25	26						
A	V	G	L	H	Y	F	S	K	G						

Tabelle 4.1: Aminosäuresequenz der synthetisierten Peptide

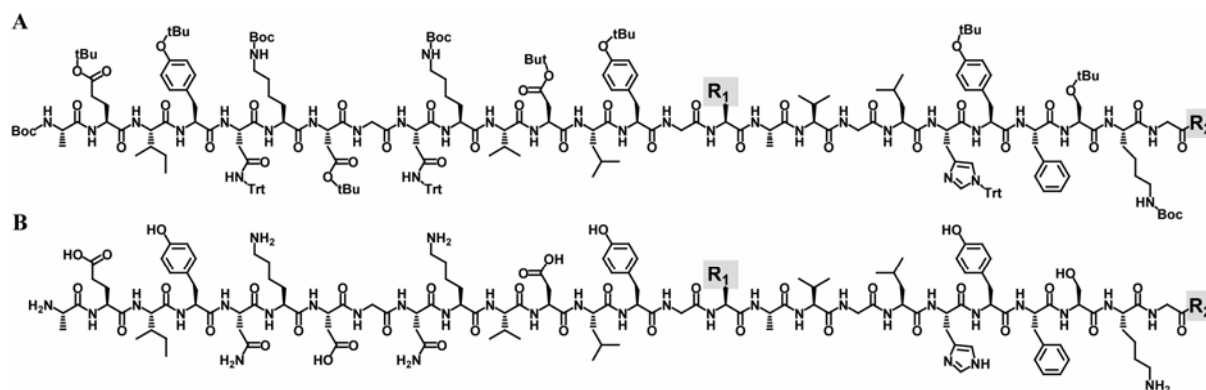


Abbildung 4.2: Schematische Abfolge der Aminosäuresequenz. (A) geschützt, (B) ungeschützt. Die variablen Reste sind mit **R₁** und **R₂** bezeichnet; Details siehe nachfolgende Tabelle.

	Position 16	Geschützt	R ₁	R ₂
7	Lysin	✓	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	-OH
8	Lysin	✓	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	-S-CH ₂ -CH ₃
9	Lysin	✗	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	-S-CH ₂ -CH ₃
10	Propargyltyrosinether II	✓		-OH
11	Propargyltyrosinether II	✓		-S-CH ₂ -CH ₃
12	Propargyltyrosinether II	✗		-S-CH ₂ -CH ₃

#	HPLC	HR-ESI (m/z)
7	t _r = 22.35 min (Rainin Dynamax C8; A: H ₂ O + 0.1% TFA, B: CH ₃ CN + 0.1% TFA, 90 → 100% B in 30 min, 0.7 mL/min, 40 °C).	C ₂₄₂ H ₃₃₈ N ₃₄ O ₄₉ [M+3K] ³⁺ ber.: 1514.8449, gef.: 1514.8444.
8	t _r = 24.36 min (Rainin Dynamax C8; A: H ₂ O + 0.1% TFA, B: CH ₃ CN + 0.1% TFA, 90 → 100% B in 30 min, 0.7 mL/min, 40 °C).	C ₂₄₄ H ₃₄₂ N ₃₄ O ₄₈ S [M+H+2Na] ³⁺ ber.: 1532.8341, gef.: 1532.8291.
9	t _r = 16.97 min (Rainin Dynamax C8; A: H ₂ O + 0.1% TFA, B: CH ₃ CN + 0.1% TFA, 10 → 95% B in 30 min, 0.7 mL/min, 40 °C).	C ₁₃₄ H ₂₀₄ N ₃₄ O ₃₈ S [M+2H] ²⁺ ber.: 1466.2484, gef.: 1466.2488.
10	t _r = 18.01 min (Rainin Dynamax C8; A: H ₂ O + 0.1% TFA, B: CH ₃ CN + 0.1% TFA, 90 → 100% B in 30 min, 0.7 mL/min, 40 °C).	C ₂₄₃ H ₃₂₉ N ₃₃ O ₄₈ [M+2Na+H] ³⁺ ber.: 1508.8081, gef.: 1508.8086.
11	t _r = 22.43 min (Rainin Dynamax C8; A: H ₂ O + 0.1% TFA, B: CH ₃ CN + 0.1% TFA, 90 → 100% B in 30 min, 0.7 mL/min, 40 °C).	C ₂₄₅ H ₃₃₃ N ₃₃ O ₄₇ S [M+3Na] ³⁺ ber.: 1530.8049, gef.: 1530.8033.

12	$t_r = 18.69$ min (Rainin Dynamax C8; A: $H_2O + 0.1\%$ TFA, C ₁₄₀ H ₂₀₃ N ₃₃ O ₃₉ S [M+2H] ²⁺ B: CH ₃ CN +0.1% TFA, 10 → 95% B in 30 min, ber.: 1502.7408, gef.: 1502.7412. 0.7 mL/min, 40 °C).
-----------	--

Tab. 4.2: Übersicht über synthetisierte Peptide sowie deren Analytik

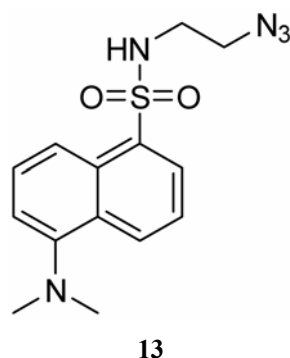
4.2. *Übersicht über synthetische Modulatoren zur Erzeugung hybrider OmpF-Poren*

Die nachfolgend gezeigten synthetischen Modulatoren wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Koert, Philipps-Universität Marburg, von Frau Dr. M. Cebi hergestellt.^[146] Alle Verbindungen wurden durch ein ¹H- und ¹³C-NMR sowie durch massenspektrometrische Analytik überprüft. Die Substanzen wurden als reiner Feststoff erhalten und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zusätzlich wurden kommerziell erhältliche Azido-Verbindungen (Molecular Probes, Invitrogen oder Fluka) für erste Testreaktionen im Rahmen dieser Arbeit verwendet, aber nicht weiter funktionell oder strukturell nach Anknüpfung an OmpF untersucht.

4.2.1. Azido-Bausteine zur Anknüpfung mittels [3+2]-Click-Chemie

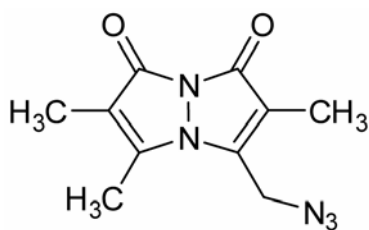
Synthetisiert:



2-Azido-1-*N*-dansylethylamin

Molekulargewicht: 319.1 g/mol

Kommerziell Erworben:

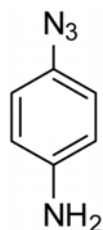


14

Bimane-Azid

Molekulargewicht:

233.2 g/mol

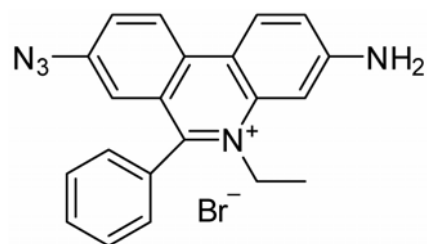


15

Anilin-Azid

Molekulargewicht:

134.1 g/mol



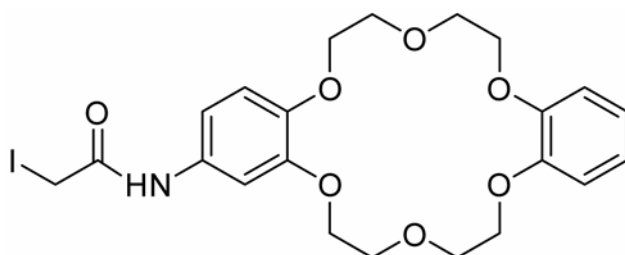
16

Ethidiumbromid-Monoazid

Molekulargewicht:

419.1 g/mol

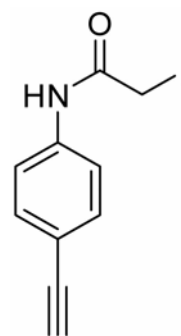
4.2.2. Iodacetamid-Bausteine zur Anknüpfung mittels S-Alkylierung



17

N-(Dibenzo-18-Krone-6-ether)-2-iod-acetamid

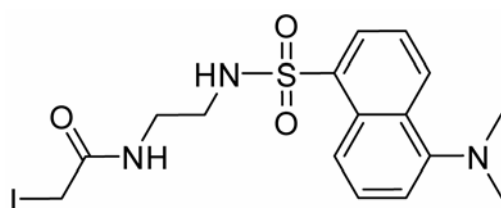
Molekulargewicht: 543.1 g/mol



18

N-(4-Ethynyl-phenyl)-2-iod-acetamid

Molekulargewicht: 285.1 g/mol

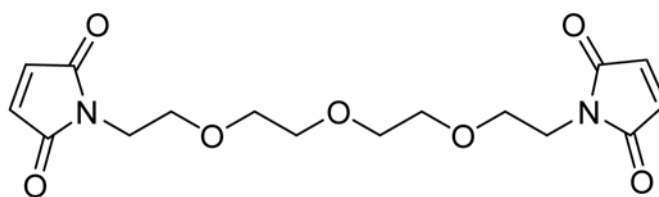


19

N-(2-Ethyl-iodoacetamid)-dansyl

Molekulargewicht: 461.3 g/mol

4.2.3. Maleimid-Baustein zur Anknüpfung an Cysteine mittels Additionsreaktion



20

1,11-Bis-Maleimidetriethylglykol [BM(PEG)₃]

Molekulargewicht: 352.1 g/mol

4.3. Expression und Aufreinigung...

4.3.1. ...des membranständigen OmpF

Das membranständige trimere OmpF mit einem Molekulargewicht von 111 kDa wurde im *E. coli* BL21 (DE3) Gold-Stamm überexprimiert, da einerseits der omp8/9-Porin-defiziente Stamm ein verlangsamtes Wachstum der Zellen aufwies und andererseits keine „Kontamination“ mit *E. coli* eigenem OmpF zu befürchten war. Wie in **Abb. 4.3 A** gezeigt konnte das native OmpF in großen Mengen überexprimiert werden. Bei der sich anschließenden Vorextraktion mit einem Puffer, der 0.5% octyl-POE enthielt, konnte bereits ein Großteil der Verunreinigungen extrahiert werden, OmpF verblieb im Pellet (**Abb. 4.3 B**). Durch die Hauptextraktion mit einem 3% octyl-POE-haltigem Puffer wurde in fünf Schritten das OmpF aus dem Membranpellet solubilisiert (**Abb. 4.3 C**). Die Reinheit der Probe wurde durch eine Gelfiltration weiter erhöht (**Abb. 4.3 D**). Ein typisches Chromatogramm der Gelfiltration zeigt **Abb. 4.4**. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit analysiert und ggf. miteinander vereinigt. Die verdünnte Proteinlösung wurde auf eine für die Kristallisation benötigte Konzentration von 8 mg/mL aufkonzentriert. Anschließend wurde das Protein gegen den entsprechenden Puffer dialysiert, wodurch sich häufig die Konzentration der Probe wieder erniedrigte und eine Wiederholung der letzten Schritte nötig war.

Durchschnittlich wurde aus einer 12 L Expressionskultur eine totale Proteinmenge von 8 – 10 mg gereinigtes OmpF erhalten, wobei bei der Gelfiltration deutliche Verluste an Protein (bis zu 50%) zu beobachten waren.

Für die elektrophysiologische Charakterisierung wurde das Protein mittels SDS-PAGE extrahiert, was aus Gründen einer vergleichbaren Probenpräparation durchgeführt wurde (siehe Kapitel 3.2.9).

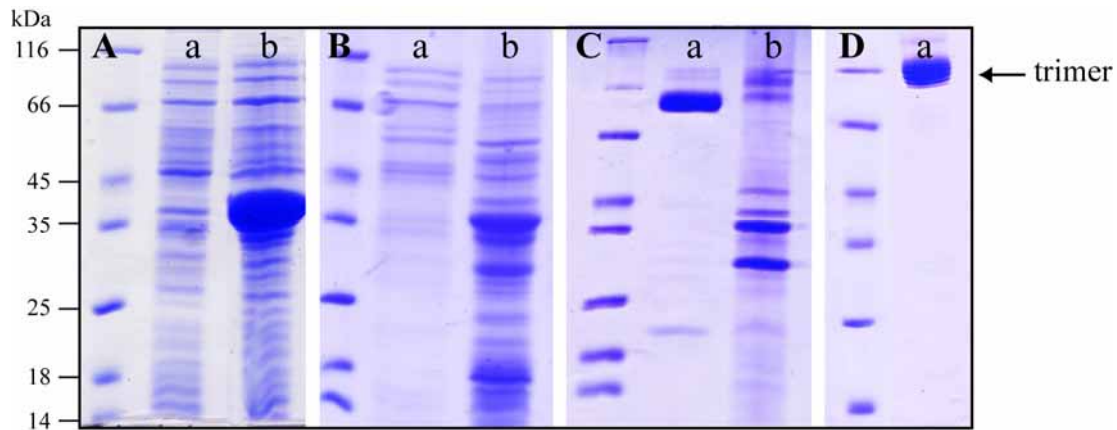


Abbildung 4.3: SDS-PAGE der Überexpression und Membranextraktion von Wildtyp OmpF. (A) a, Zellkultur vor Induktion; b, 4 h nach Induktion, denaturiert, Monomer-Molekulargewicht von 37 kDa. (B) 1. Vorextraktion, a, Überstand; b, Pellet, beide denaturiert. (C) 1. Hauptextraktion, a, Überstand; b, Pellet, beide nativ. (D) a, Probe nach Gelfiltration, nativ.

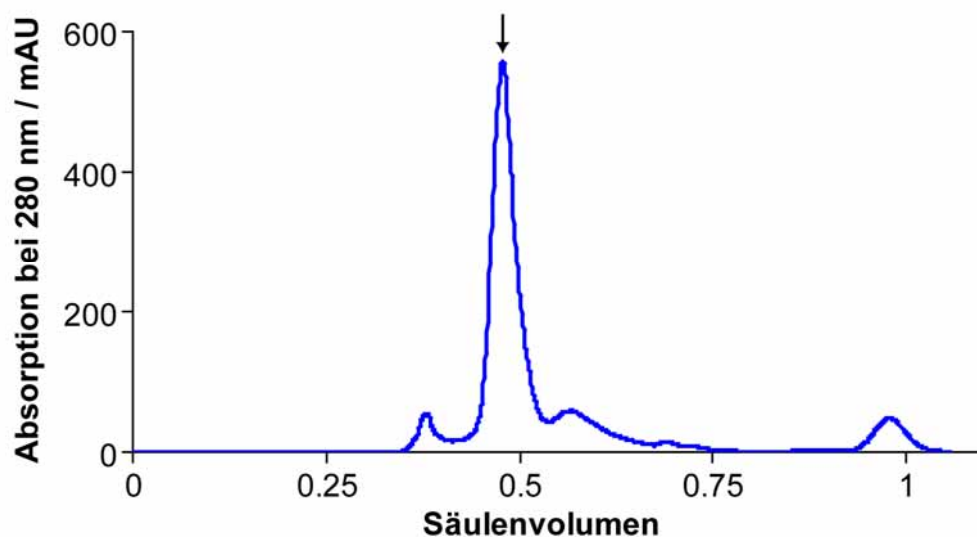


Abbildung 4.4: Typisches Gelfiltrationschromatogramm einer OmpF-Wildtyp-Aufreinigung. Der Pfeil kennzeichnet den Peak, der das trimere OmpF enthält. Es wurde eine Superdex 200 16/60 pg-Säule mit einem Volumen von ~120 mL verwendet.

4.3.2. ...des nativen OmpF in Form von *inclusion bodies*

Zur Etablierung der Rückfaltung und als Referenz für elektrophysiologische Untersuchungen wurde OmpF ohne Signalsequenz in Form von *inclusion bodies* im *Omp*-defizienten omp8/9-Stamm überexprimiert. **Abb. 4.5**, a zeigt die deutlich sichtbare Bande der Überexpression des 37 kDa-Proteins. Durch Resuspendieren mittels Potter-Homogenisator in Triton X-100-haltigem Puffer (siehe **Abb. 4.5**, b-f) konnte ein Großteil von Verunreinigungen abgetrennt werden. Die *inclusion bodies* wurden in einem sauberen Zustand erhalten (**Abb. 4.5**, g), was

sich durch eine rein-weiße Farbe äußerte. Ein weiterer Aufreinigungsschritt wie z. B. Ionenaustauscherchromatographie unter denaturierenden Bedingungen war nicht nötig, da sich die Verunreinigungen nicht negativ auf die Rückfaltung auswirkten und diese im Anschluss an die Rückfaltung tryptisch verdaut wurden.

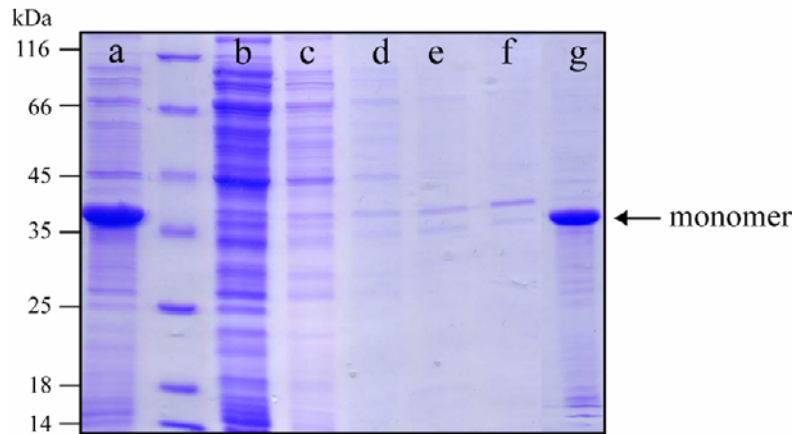


Abbildung 4.5: SDS-PAGE der Überexpression und *inclusion bodies*-Reinigung von nativem OmpF. Der Pfeil kennzeichnet die Höhe der Bande des OmpF-Monomers. a, Zellkultur 4 h nach Induktion; b-f, Überstand nach Waschen und Zentrifugation der *inclusion bodies*; g, gereinigte *inclusion bodies*.

4.3.3. ...der OmpF-Deletions- und Cystein-Mutanten in Form von *inclusion bodies*

Das 34 kDa schwere OmpF- $\Delta(1-26)$ -N27C-Fragment, das ohne die ersten 26 Aminosäuren und zusätzlich mit einer Asn27Cys-Mutation exprimiert wurde, konnte unter Standard-Expressionsbedingungen in gewohnt guten Mengen produziert werden (150 – 200 mg gereinigte IBs/L Expressionskultur).

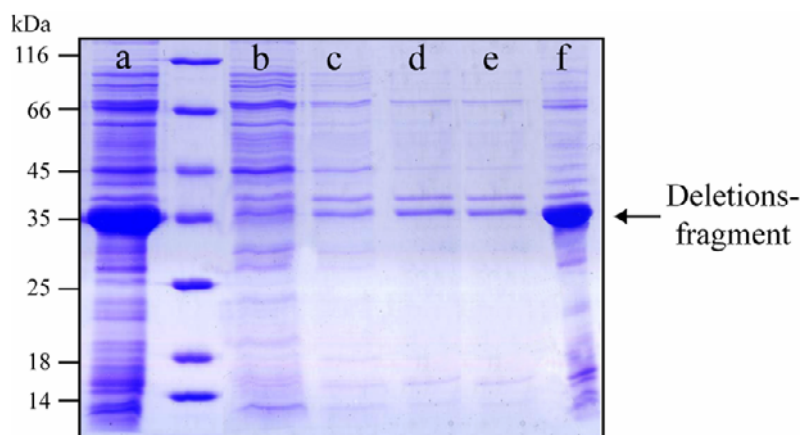


Abbildung 4.6: SDS-PAGE der Überexpression und *inclusion bodies*-Reinigung von OmpF- $\Delta(1-26)$ -N27C. Der Pfeil kennzeichnet die Höhe der Bande des Proteinfragments. a, Zellkultur 4 h nach Induktion; b-e, Überstand nach Waschen und Zentrifugation der *inclusion bodies*; f, gereinigte *inclusion bodies*.

Die auf diese Weise erhaltenen *inclusion bodies* (**Abb. 4.6**) konnten ohne weitere Aufreinigung für die NCL verwendet werden, da nur N-terminale Cysteine in der Lage sind, den zweiten irreversiblen Schritt der NCL durchzuführen. NCL-Experimente, bei denen durch Ionentauscherchromatographie gereinigte *inclusion bodies* verwendet wurden, zeigten keine Verbesserung der Ausbeute (nicht gezeigt).

Bei der Überexpression der OmpF-Cystein-Mutanten kam es wiederholt zu Problemen. Übernackulturen, die mit einem Transformanden angeimpft wurden, der einer frischen LB-Agar-Platte entstammte, wuchsen nur zum Teil an. Die Zellen zeigten ein erheblich verlangsamtes Wachstum. Auch zeigten nicht alle Zellkulturen, die in dem Medium anwuchsen, eine Expression des gewünschten rekombinanten Gens oder das Genprodukt zeigte eine deutlich zu kleine Laufhöhe in der SDS-PAGE.

Daher wurde standardmäßig eine Vielzahl von Übernackulturen angesetzt und diese mittels SDS-PAGE getestet, bevor die Hauptkultur angeimpft wurde. Es wurde weiterhin darauf geachtet, dass bei den Übernackulturen keine hohen Zelldichten erreicht wurden.

Durch diese Prozedur konnten alle Cystein-(Doppel)Mutanten überexprimiert und gereinigt werden. In **Abb. 4.7** ist exemplarisch eine SDS-PAGE der N27C-Mutante gezeigt.

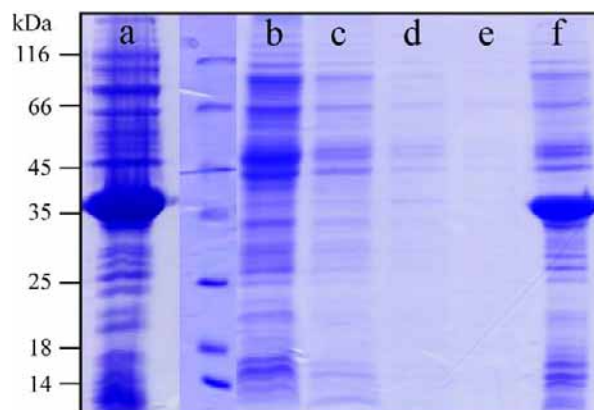


Abbildung 4.7: SDS-PAGE der Überexpression und *inclusion bodies*-Reinigung der OmpF-N27C Mutante. a, Zellkultur 4 h nach Induktion; b-e, Überstand nach Waschen und Zentrifugation der *inclusion bodies*; f, gereinigte *inclusion bodies*.

4.4. Ergebnisse der Nativen Chemischen Ligation

Durch die Native Chemische Ligation wurde das synthetische Oligopeptid, das in zwei Varianten erzeugt wurde, an die rekombinant produzierte OmpF-Deletionsmutante gekoppelt. Für den Schnitt im OmpF-Molekül wurde die Schleifenregion L1 ausgewählt. Das 26 Aminosäuren-lange Peptid entspricht β -Strang 1 sowie Teile von β -Strang 16 (siehe **Abb. 4.8**, orange). Das Peptid wurde in der nativen Variante (Lysin-Rest an Position 16) sowie in der modifizierten Variante (Lysin-Rest gegen den Propargyltyrosin-etherbaustein **II** ausgetauscht) erzeugt. An letzterem wurden durch die sich anschließende [3+2]-Click-Reaktion synthetische Modulatoren eingeführt (siehe Kapitel 4.6). In **Schema 4.1** sind die beiden durch NCL gewonnenen OmpF-Hybride **22** und **23** dargestellt.

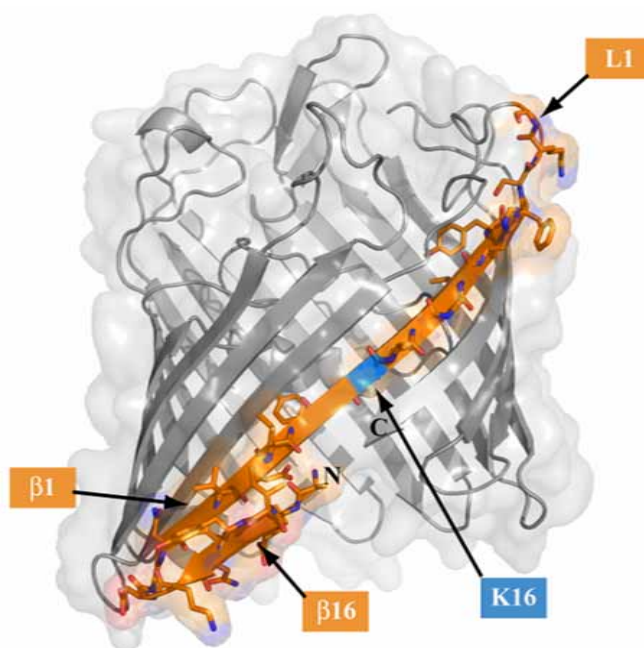
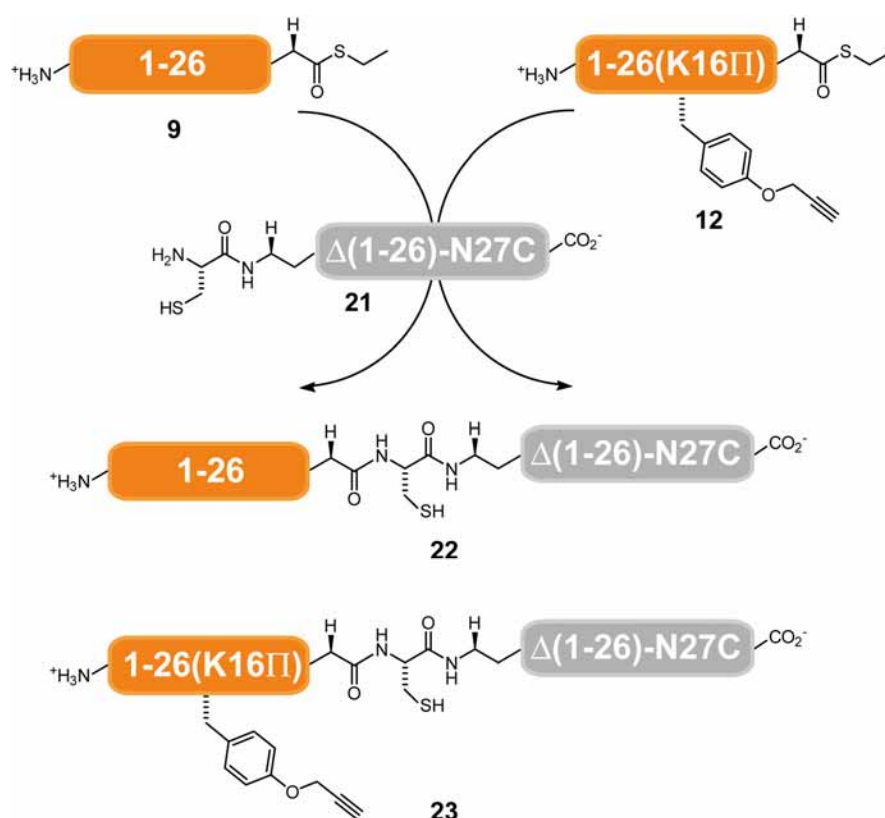


Abbildung 4.8: Seitenansicht der OmpF-Pore, bei der das über SPPS synthetisierte Peptid in orange dargestellt wurde; die restlichen 314 aa sind in grau und Lys16 ist in blau dargestellt.



Schema 4.1: Durch die NCL der Oligopeptide mit dem 314 aa Proteinfragment wurden das native Protein **22** sowie das an Position 16 modifizierte Protein **23** erzeugt.

Um die optimalen Reaktionsbedingungen zu finden, wurde mit dem modifizierten Peptid **23** ein Screen von verschiedenen Parametern wie pH, Temperatur und der Katalysator-Konzentration (MPAA) durchgeführt. Die genauen Bedingungen sind **Tab. 4.3** zu entnehmen. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer von 16 auf 24 oder 40 h ergab keinen signifikanten Zuwachs an NCL-Produkt (nicht gezeigt). Außerdem wurde bei einer längeren Inkubationsdauer als 16 h bei der höheren der beiden getesteten Temperaturen Proteindegradation beobachtet. Als Negativkontrolle der Reaktion wurde eine Reaktionsmischung ohne MPAA verwendet. Des Weiteren wurde das 26er Oligopeptid als freie Carboxy-Säure am C-Terminus eingesetzt und überprüft, ob das Ligationsprodukt entsteht.

Als optimale Bedingungen für die NCL wurde eine Inkubationstemperatur von 40 °C, eine MPAA-Konzentration von 10 mM und ein Puffer-pH von 7.3 ermittelt (**Abb. 4.9 A** und **B**, Spur e). Das NCL-Produkt konnte in einer Ausbeute von etwa 50% für das native und rund 30% für das modifizierte Peptid erhalten werden. Das erhaltene Ligationsprodukt besitzt ein Molekulargewicht von 37 kDa, während die Deletionsmutante ein Gewicht von 34 kDa aufweist. Die Proteinbanden mit einer Differenz von 3 kDa sind in der SDS-PAGE gut erkennbar.

Die Negativkontrolle ohne MPAA (**Abb. 4.9 B**, Spur i) weist einen geringen Umsatz auf. Dieses wird durch die geringe aber dennoch existente Reaktivität des eingesetzten Ethylthioesters erklärt. Die Kontrolle mit dem Peptid, das als freie Carboxysäure eingesetzt wird, weist kein Produkt der Reaktion auf, da der Thioester als Abgangsgruppe unabdinglich ist.

Die Ergebnisse der Rückfaltung der NCL-Produkte sind in Kapitel 4.7 gezeigt.

	a	b	c	d	e	f	g	h	i
pH-Wert	7.3	8.5	7.3	8.5	7.3	8.5	7.3	8.5	7.3
MPAA-Konzentration / mM	10	10	20	20	10	10	20	20	-
Temperatur / °C	25 °C				40 °C				40 °C

Tabelle 4.3: Übersicht über veränderte Parameter der NCL. Die entsprechenden SDS-PAGE sind in **Abb. 4.9 A** und **B** dargestellt.

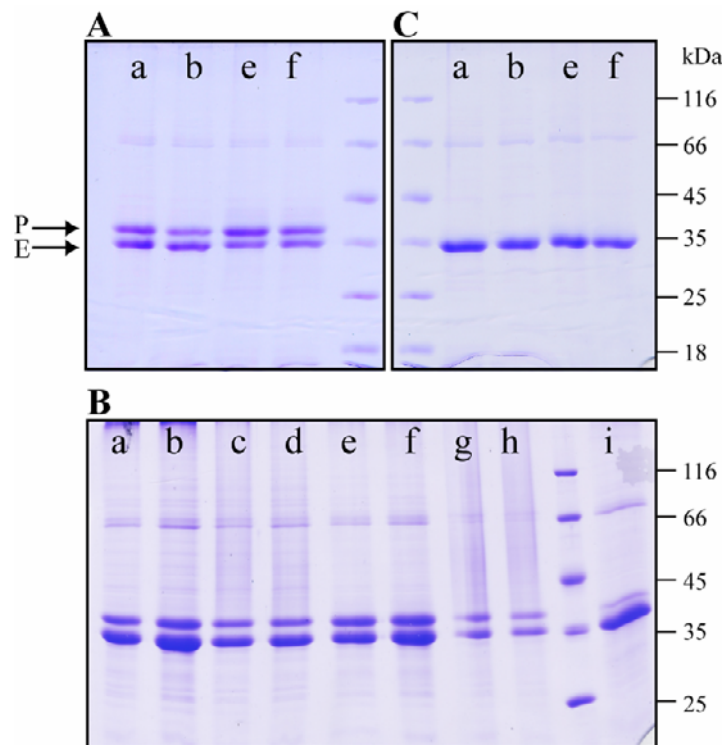


Abbildung 4.9: SDS-PAGE der NCL mit drei unterschiedlichen Peptiden in verschiedenen Bedingungen (siehe **Tab. 4.2**). Eingesetzt wurde das Peptid entsprechend (A) der nativen Sequenz; (B) der modifizierten Sequenz und (C) mit der freien Säure am C-Terminus. Die Gelproben wurden nach einer Inkubationsdauer von 16 h entnommen. P = Produkt der NCL, E = Edukt: solubilisiertes OmpF- $\Delta(1-26)$ -N27C 21.

4.5. S-Alkylierungsreaktionen an Cystein-Mutanten von OmpF

Die S-Alkylierungsreaktion wurde unter denaturierenden Bedingungen in 6 M Harnstoff durchgeführt. Die Reaktion zeichnet sich durch seinen hohen Reaktionsumsatz aus (> 95%), der bereits nach 90 min erreicht wurde. Da die Iodacetamid-haltige Verbindung im 10-fachen Überschuss zugesetzt wurde, sind im Hintergrund ablaufende Alkylierungsreaktionen an verunreinigenden Cystein-haltigen Proteinen vernachlässigbar, solange die Reinheit der Probe ausreichend ist. Die Aufarbeitung erfolgte im Anschluss an die Reaktion über eine schnell durchzuführende Entsalzungssäule, gefolgt von der Rückfaltung und tryptischem Verdau. Die Methode erwies sich als effiziente Möglichkeit hybride OmpF-Kanäle darzustellen. Problematisch ist der Einsatz jedoch dann, wenn das zu modifizierende Protein weitere Cysteine enthält, da diese entsprechend mitmodifiziert werden. Zur Vermeidung müssen diese Reste ggf. in andere Reste mutiert oder deletiert werden. Alternativ kann in diesem Fall eine Strategie verwendet werden, bei dem das Zielprotein aus zwei Fragmenten aufgebaut wird, wie es beispielsweise durch NCL geschieht. Beide Hälften können unabhängig voneinander modifiziert und anschließend verknüpft werden.

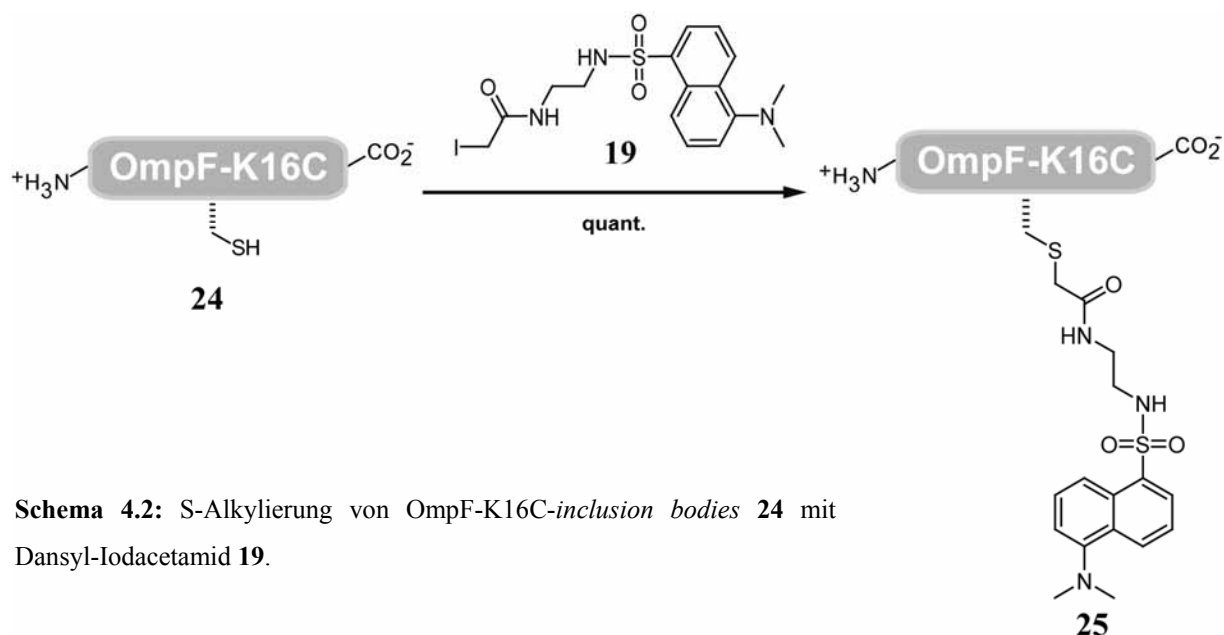
In der vorliegenden Arbeit diente die OmpF-K16C-Mutante als Standardprotein für die einzuführenden Modifikationen mittels S-Alkylierung. Rest 16 liegt in der Mitte des β -Strangs 1 direkt gegenüber der Engstelle der Pore, die durch die L3-Schleife gebildet wird. Hier sollte der Effekt eines eingebauten synthetischen Modulators maximal sein.

Die S-Alkylierungsreaktion wurde auch auf weitere OmpF-Mutanten angewendet. Da hierfür der Iodacetamid-Alkin-Linker **18** mit anschließender [3+2]-Click-Reaktion verwendet wurde, findet sich die Beschreibung der Ergebnisse in Kapitel 4.6.2 wieder.

Insgesamt wurden zwei verschiedene Verbindungen durch S-Alkylierung in die OmpF-Pore eingebracht, die Ergebnisse sind im Folgenden beschrieben.

4.5.1. S-Alkylierung von OmpF-K16C mit Dansyl-Iodacetamid **19**

Das fluoreszierende Dansyl-Derivat **19** wurde unter denaturierenden Bedingungen in 6 M Harnstoff kovalent an die Thiolgruppe von Cys16 gekoppelt (Schema 4.2). Mithilfe dieser Verbindung konnte die Reaktionskontrolle qualitativ durch SDS-PAGE durchgeführt werden (Abb. 4.10). Die massenspektrometrische Analyse zeigte einen quantitativen Reaktionsumsatz, da das unmodifizierte Cystein-enthaltende Peptid-Fragment nicht detektiert werden konnte (für Details siehe Kapitel 7.1.3). In Vergleichsmessungen konnte letzteres jedoch zweifelsfrei gefunden werden.



Schema 4.2: S-Alkylierung von OmpF-K16C-inclusion bodies **24** mit Dansyl-Iodacetamid **19**.

Das Produkt der Alkylierungsreaktion konnte in guter Ausbeute zurückgefaltet werden (70%). Die SDS-PAGE-extrahierte Probe zeigt in der PAGE eine hohe Reinheit (**Abb. 4.10**) und wurde funktionell charakterisiert.

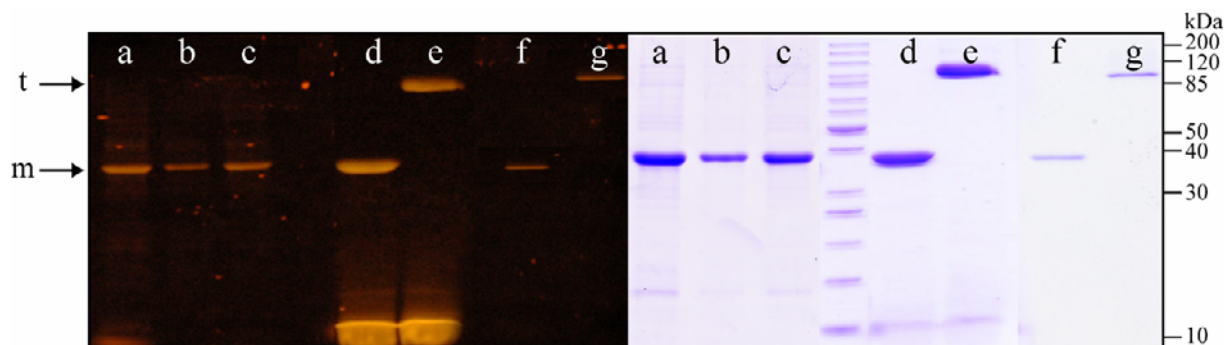


Abbildung 4.10: SDS-PAGE der S-Alkylierung in Harnstoff-haltiger Lösung von OmpF-K16C mit dem Dansyl-Iodacetamid **19** unter UV-Licht (links) und nach Coomassie-Anfärbung (rechts). Die Pfeile markieren das OmpF-Monomer (m) bzw. das Trimer (t). a, Produkt der Reaktion; b, nach Entsalzungssäule; c, nach Aufkonzentration; d, nach Rückfaltung und trypt. Verdau, denaturiert; e, nach Rückfaltung und trypt. Verdau, nativ; f, nach SDS-PAGE-Extraktion, denaturiert; g, Probe f, nativ.

Die Aufarbeitung der Reaktion, sprich die Abtrennung überschüssiger Reaktanten, ist schneller und effizienter im denaturierten Zustand durchzuführen. Im rückgefalteten nativen Zustand könnte beispielsweise eine Ionenaustausch-Chromatographie mit detergentzhaltigem Puffer durchgeführt werden, die aber zeitaufwendiger und teurer ist. Dennoch wurde das Experiment durchgeführt, ob die S-Alkylierungsreaktion prinzipiell auch im korrekt gefalteten Zustand der Pore durchführbar ist. Hierfür muss das Dansyl-Iodacetamid in die Pore diffundieren und kann dort nur mit einem Rest, der für das Molekül zugänglich ist, reagieren. Es stellte sich heraus, dass die Reaktion unter diesen Bedingungen möglich ist, und die OmpF-Bande in der SDS-PAGE unter UV-Licht fluoresziert (**Abb. 4.11**). Eine quantitative Bestimmung der Reaktion konnte aufgrund der detergentzhaltigen Lösung nicht durchgeführt werden.

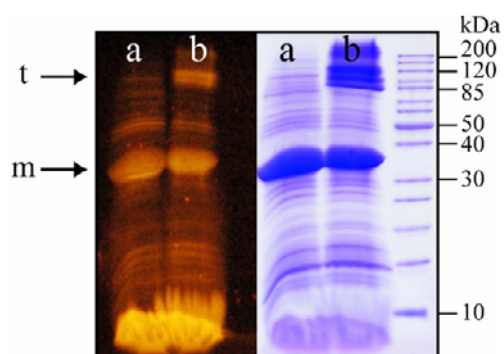
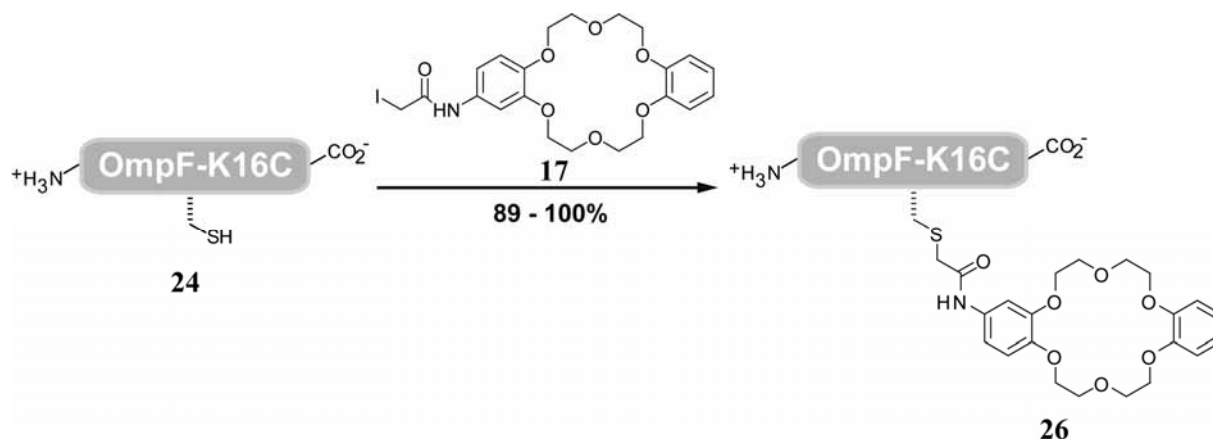


Abbildung 4.11: SDS-PAGE der S-Alkylierung von OmpF-K16C im nativen Zustand mit dem Dansyl-Iodacetamid **19** unter UV-Licht (links) und nach Coomassie-Anfärbung (rechts). Die Pfeile markieren das OmpF-Monomer (m) bzw. das Trimer (t). a, Reaktionsprodukt, denaturiert; b, Reaktionsprodukt, nativ.

4.5.2. S-Alkylierung von OmpF-K16C mit der Dibenzo-18-Krone-6 **17**

Wie im vorangestellten Abschnitt beschrieben wurde in gleicher Weise die Dibenzo-18-Krone-6 **17** kovalent an OmpF-K16C durch S-Alkylierung gebunden (**Schema 4.3**). Die Ausbeute der Reaktion betrug ~90 – 100% (für Details siehe Kapitel 7.1.3).



Schema 4.3: S-Alkylierung von **24** mit der Dibenzo-18-Krone-6 **17**.

Die SDS-PAGE der Reaktion und der Folgeschritte ist in **Abb. 4.12** dargestellt. Die Rückfaltungseffizienz wurde nicht durch die Verknüpfung mit der Dibenzo-18-Krone-6 (**17**) verändert. Für die funktionelle Untersuchung wurden Proben über die SDS-PAGE-Extraktion präpariert. Für Kristallisationszwecke wurde ein größerer Ansatz der Reaktion angesetzt, bei dem 37 mg der *inclusion bodies* **24** und 5.4 mg von **17** eingesetzt wurden. Das ungefaltete Monomer wurde vom rückgefalteten OmpF durch tryptischen Verdau abgetrennt und anschließend zwei Ionenaustauscherchromatographie-Läufe durchgeführt. **Abb. 4.13** zeigt eines der beiden erhaltenen Chromatogramme. Im Durchfluss eluiert nicht gebundenes und durch Trypsin verdautes Protein; das Protein wurde bei einer Natriumchlorid-Konzentration von 350 mM in reiner Form von der Säule eluiert und im Anschluss aufkonzentriert, dialysiert und kristallisiert.

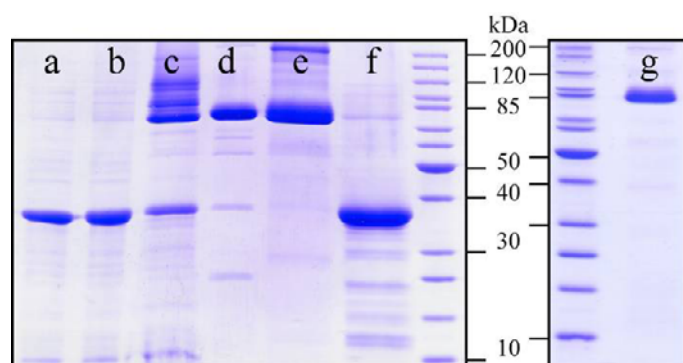


Abbildung 4.12: SDS-PAGE der S-Alkylierung von OmpF-K16C **24** mit der Dibenzo-18-Krone-6 **17**. a, *inclusion bodies* von **24**; b, Reaktionsprodukt **26**; c, rückgefaltetes **26**; d, **26** nach Rückfaltung und tryptischem Verdau; e, **26** nach Aufreinigung, nativ; f, **26** nach Aufreinigung, denaturiert; g, **26** nach IEX, nativ.

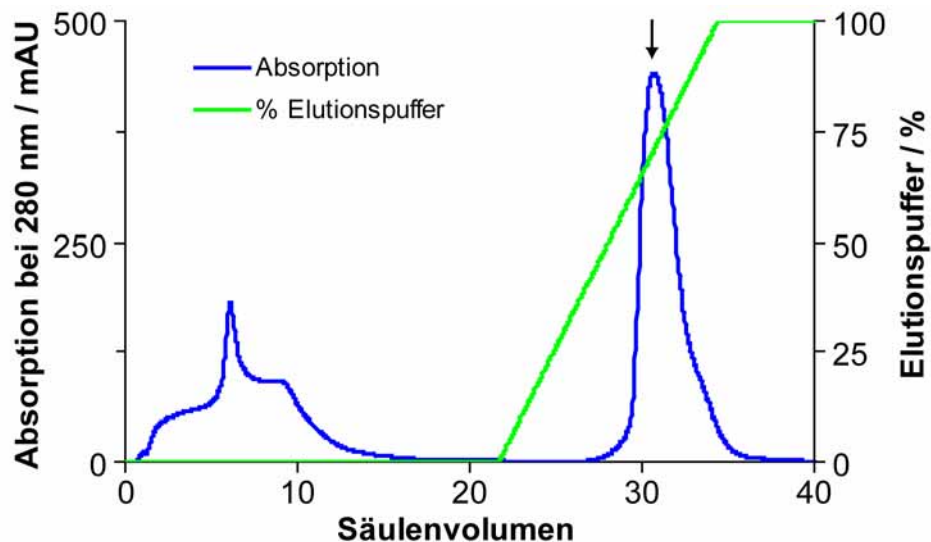
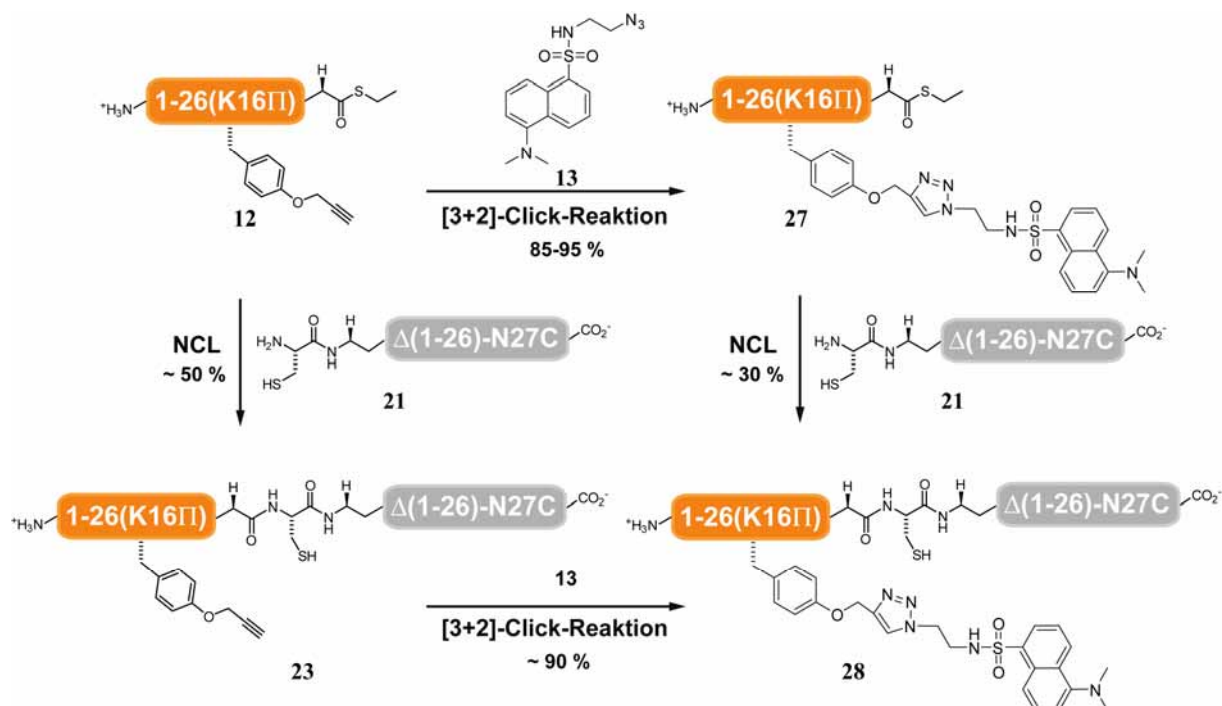


Abbildung 4.13: Typisches Chromatogramm der IEX (HiTrap DEAE-Sepharose FF, 1 mL) von **26**. Im Elutionspuffer sind 500 mM NaCl enthalten. Der Pfeil markiert den Elutionspeak des trimeren OmpF-Cys16-17.

4.6. [3+2]-Click-Reaktion...

4.6.1. ...an OmpF, erzeugt durch NCL und modifiziert mit Propargyltyrosinether **II**

Durch Native Chemische Ligation zwischen rekombinant erzeugtem OmpF- $\Delta(1-26)$ -N27C **21** und dem durch SPPS hergestellten 26er Peptidbaustein **12** wurde als funktionelle Gruppe der Propargyltyrosinether **II** eingeführt. Prinzipiell stehen zwei Routen zur Verfügung, die NCL-Reaktion mit der [3+2]-Click-Reaktion miteinander zu verknüpfen: a) das Peptid wird mit der Azido-Verbindung durch die [3+2]-Click-Reaktion modifiziert und anschließend findet die NCL statt; oder b) die Schritte werden in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt (**Schema 4.4**).



Schema 4.4: Zwei Routen zur Erzeugung hybrider OmpF-Kanäle durch die Kombination von NCL und [3+2]-Click-Chemie. Route a) Durch [3+2]-Click-Chemie mit der Azido-Verbindung **13** und dem synthetischen Oligopeptid **12** wird **27** erzeugt und anschließend durch NCL mit dem N-terminalen OmpF-Fragment **21** kombiniert. In Route b) wird der NCL-Schritt zwischen **12** und **21** vorangestellt. Im Anschluss daran wird die [3+2]-Click-Chemie zwischen **23** und **13** durchgeführt und **28** erhalten. Die Ausbeuten der jeweiligen Reaktionen sind angegeben.

In dieser Arbeit wurden beide Routen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt und miteinander verglichen. Der Vorteil von Route a) ist die Möglichkeit, das modifizierte Peptid über HPLC zu reinigen (**Abb. 4.14**). Bei der sich anschließenden NCL wird das quantitativ modifizierte Oligopeptid eingesetzt, sodass nur eine Spezies OmpF entsteht. Bei Route b) kann das Produkt der [3+2]-Click-Reaktion nicht von unreaktierten Molekülen getrennt werden. Da der Reaktionsumsatz nicht quantitativ verläuft, entstehen so gemischte Hybride, was bei der funktionellen Charakterisierung Probleme bereiten kann.

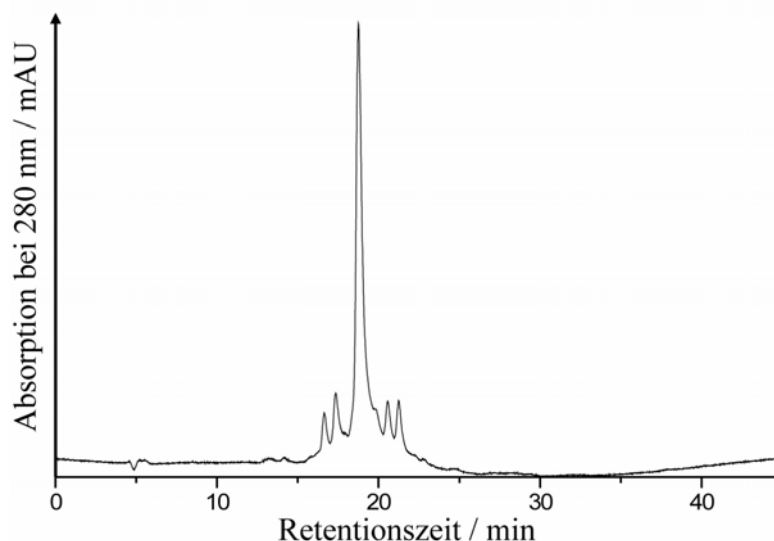


Abbildung 4.14: HPLC-Chromatogramm der Verbindung **27** ($t_r = 18.8$ min). $\lambda = 280$ nm, PLRP-S, A: H_2O (+ 0.1% TFA), B: CH_3CN (+ 0.1% TFA), 10% \rightarrow 95% B in 30 min, 0.7 mL/min, 40 °C. Die HPLC-Chromatographie wurde von Frau Dr. M. Cebi durchgeführt.^[146]

Die NCL verläuft mit dem unmodifizierten Oligopeptid **12** in etwas höherer Ausbeute (~50%) als mit dem Dansyl-modifiziertem Peptid **27** (~30%), wie durch densitometrische Analyse der SDS-PAGE bestimmt wurde. Bei der [3+2]-Click-Reaktion wurde bei beiden Routen ein vergleichbarer Reaktionsumsatz von rund 90% gefunden.

Um die [3+2]-Click-Reaktion über Route b) durchführen zu können, war der Dialyse-Schritt nach der NCL entscheidend. Durchgeführte Kontroll-Experimente der [3+2]-Click-Reaktion zwischem OmpF-K16C-**18** und dem Dansyl-Azid **13** unter NCL-

Bedingungen zeigten (**Abb. 4.15**), dass die Reaktion durch die Anwesenheit des Katalysators MPAA inhibiert wurde, da wahrscheinlich das Kupferion komplexiert vorlag.

Bei der Rückfaltung des hybriden OmpF **28** wurden Unterschiede bei der angewendeten Präparationsmethode beobachtet. Das über Route a) erzeugte OmpF ließ sich in besseren Ausbeuten rückfalten als das über Route b), möglicherweise bedingt durch eine stärkere Heterogenität der Proteinprobe. **Abb. 4.16** zeigt die SDS-PAGE von modifiziertem OmpF über beiden Routen. Die Ursache der Doppelbande nach Denaturierung der aufgereinigten Probe wurde experimentell untersucht und ist in Kapitel 4.7 beschrieben.

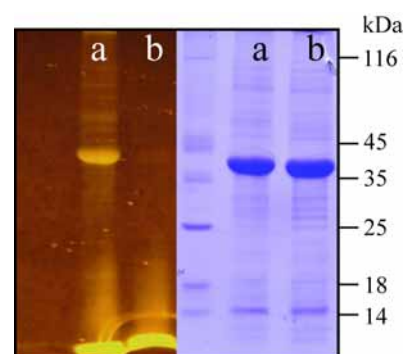


Abbildung 4.15: SDS-PAGE des Kontroll-Experimentes unter UV-Licht (links) und nach Coomassie-Anfärbung (rechts). a, Standard-Reaktionsansatz der [3+2]-Click-Reaktion; b, Click-Reaktionsansatz nach Zugabe von 10 mM MPAA.

Die Ausbeute der erhaltenen Biohybride war bedingt durch relativ viele Reaktions- und Zwischenschritte mit etwa 0.5 - 1 mg verhältnismäßig gering. Für die funktionelle Charakterisierung der erhaltenen OmpF-Hybride (siehe Kapitel 4.9.3.1) konnten in ausreichenden Mengen Proben erzeugt werden, für Kristallisationsexperimente jedoch mussten größere Reaktionsansätze durchgeführt werden. Abschließend lässt sich sagen, dass die Zugänglichkeit von hybriden OmpF-Poren über beide Routen möglich ist, Route a) jedoch aufgrund der o. g. Vorteile die effizientere ist.

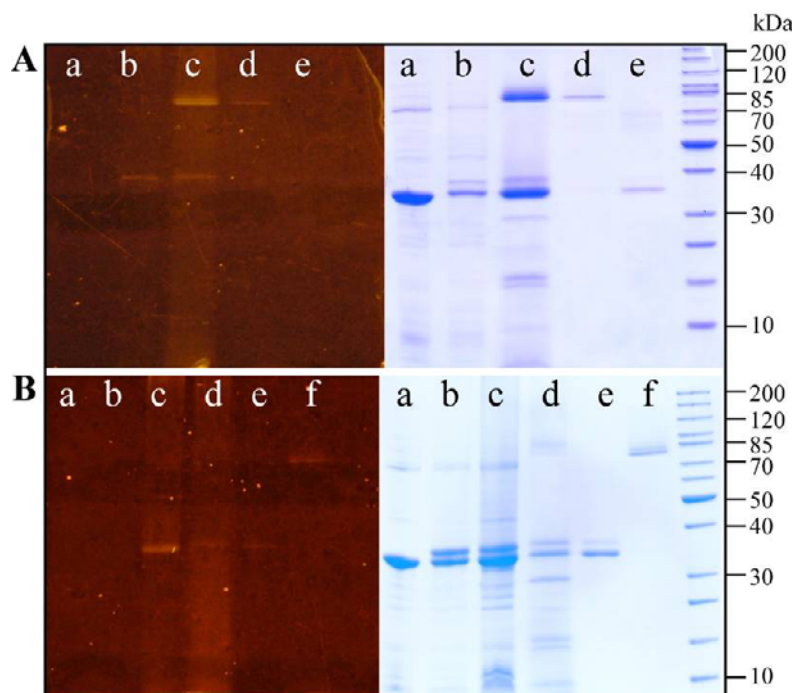


Abbildung 4.16: SDS-PAGE der kombinierten NCL und Click-Chemie zwischen OmpF- $\Delta(1-26)$ -N27C **21**, dem Oligopeptid **12** und dem Dansyl-Azid **13** unter UV-Licht (links) und nach Coomassie-Anfärbung (rechts). (**A**) Route a), a, *inclusion bodies* von **21**; b, NCL-Produkt **28** aus **27+21**; c, rückgefaltetes **28**; d, **28** nach Aufreinigung; e, **28** nach Aufreinigung, denaturiert. (**B**) Route b), a, *inclusion bodies* von **21**; b, NCL-Produkt **23**; c, **28** als das Produkt von **23+13**; d, rückgefaltetes **28**; e, **28** nach Aufreinigung, denaturiert, f, **28** nach Aufreinigung, nativ.

4.6.2. ...an OmpF-Cystein-Mutanten, die bereits durch den Iodacetamid-Alkin-Linker **18** modifiziert waren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Cystein-Mutanten erzeugt, die als Einzel- oder Doppelmутanten vorliegen (siehe Kapitel 3.1.2). Die Mutationsstellen der Einzelmутanten befinden sich an Position 16 in der Mitte des β -Strangs 1 sowie am „Boden“ der Pore, der dem Periplasma zugewandt ist (181, β -Strang 8; 221, β -Strang 10; 226, β -Strang 11; **Abb. 4.17**). Diese Mutationenstellen wurden nach genauer Inspektion der Struktur ausgewählt, bei der auf richtige Orientierung der Seitenketten sowie Zugänglichkeit für synthetische Moleküle

geachtet wurde. Weiterhin wurden sie gewählt, um mögliche 2-Punkt-Anknüpfungsstellen zu etablieren sowie um den Effekt von Modulatoren am Rand der Pore zu untersuchen.

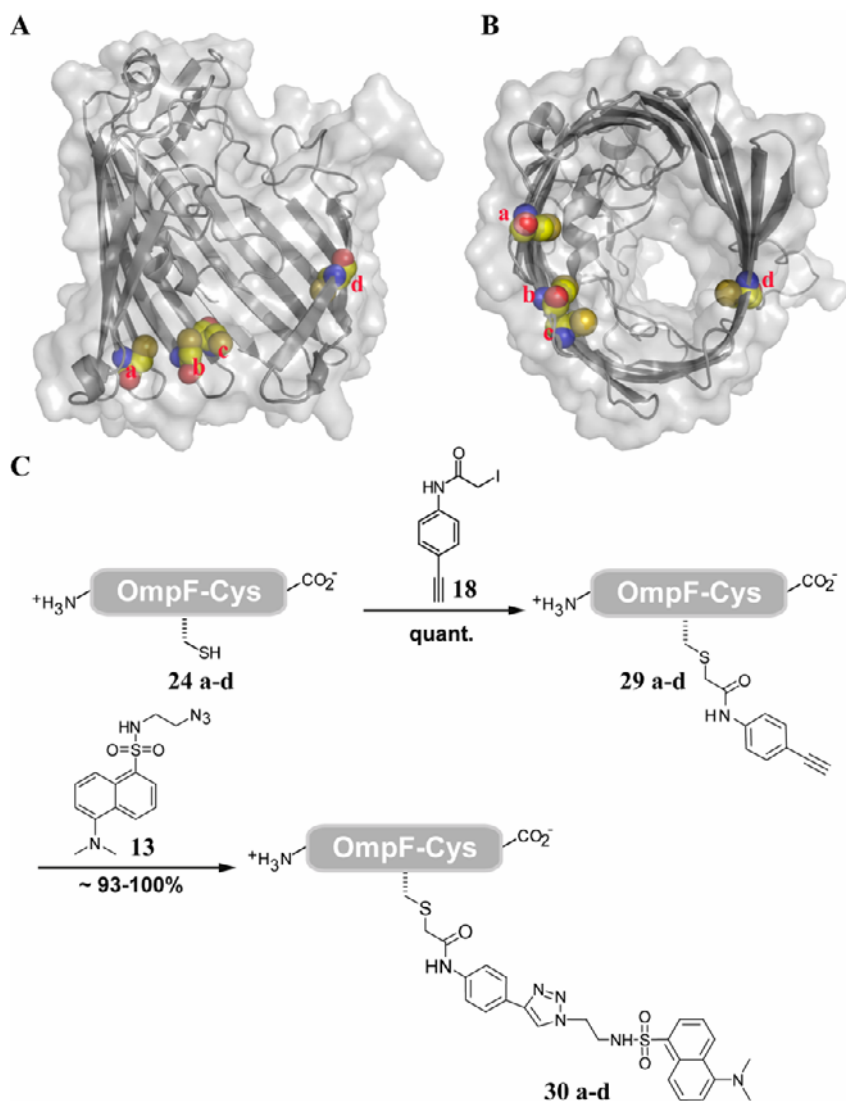


Abbildung 4.17: Darstellung und Reaktionsschema der vier verwendeten OmpF-Cystein-Mutanten für die Modifikation mittels S-Alkylierung und [3+2]-Click-Reaktion. Die im CPK-Modell dargestellten Aminosäuren entsprechen den folgenden Mutationsstellen: a = E181C; b = D221C; c = Y226C; d = K16C. (A) Seitenansicht der Pore, die β-Stränge 1-4 wurden zur besseren Übersicht ausgeblendet. (B) Ansicht entlang der Porenachse. (C) Die *inclusion bodies* der Cystein-Mutanten a-d wurden mit **18** S-alkyliert, aufgearbeitet und mit Dansyl-Azid **13** kupferkatalysiert umgesetzt.

An den Seitenketten der Cysteine ist es möglich, durch eine S-Alkylierungsreaktion den Iod-Acetamid-Linker **18** einzuführen. An der auf diese Weise eingeführten funktionellen Alkin-Gruppe kann mittels [3+2]-Click-Chemie eine synthetische Verbindung, die über eine Azid-Funktion verfügt, eingeführt werden. Da die Erzeugung von Cystein-Mutanten wesentlich schneller durchzuführen ist als die kombinierte Semisynthese von SPPS und NCL (siehe vorangestelltes Kapitel), ist die ortsspezifische Mutation und anschließende S-Alkylierungsreaktion eine (zeit)effizientere Methode zur Durchführung der [3+2]-Click-Reaktion innerhalb der Pore. Ein Vorteil der SPPS/NCL-Methode besteht jedoch darin, dass verschiedenste Funktionalitäten in die Pore eingebracht werden können.

Durch die Anbringung von synthetischen Modulatoren an verschiedene Positionen innerhalb der Pore sollte untersucht werden, ob ein ortsspezifischer Effekt zu beobachten ist. Für die [3+2]-Click-Reaktion wurde als eine Modellverbindung das fluoreszierende Dansyl-Azid **19** eingesetzt. Dieses Molekül hat den Vorteil, dass der Erfolg der Reaktion nach gelelektrophoretischer Trennung der Probe schnell und einfach qualitativ unter dem UV-Licht sichtbar ist (siehe **Abb. 4.18**).

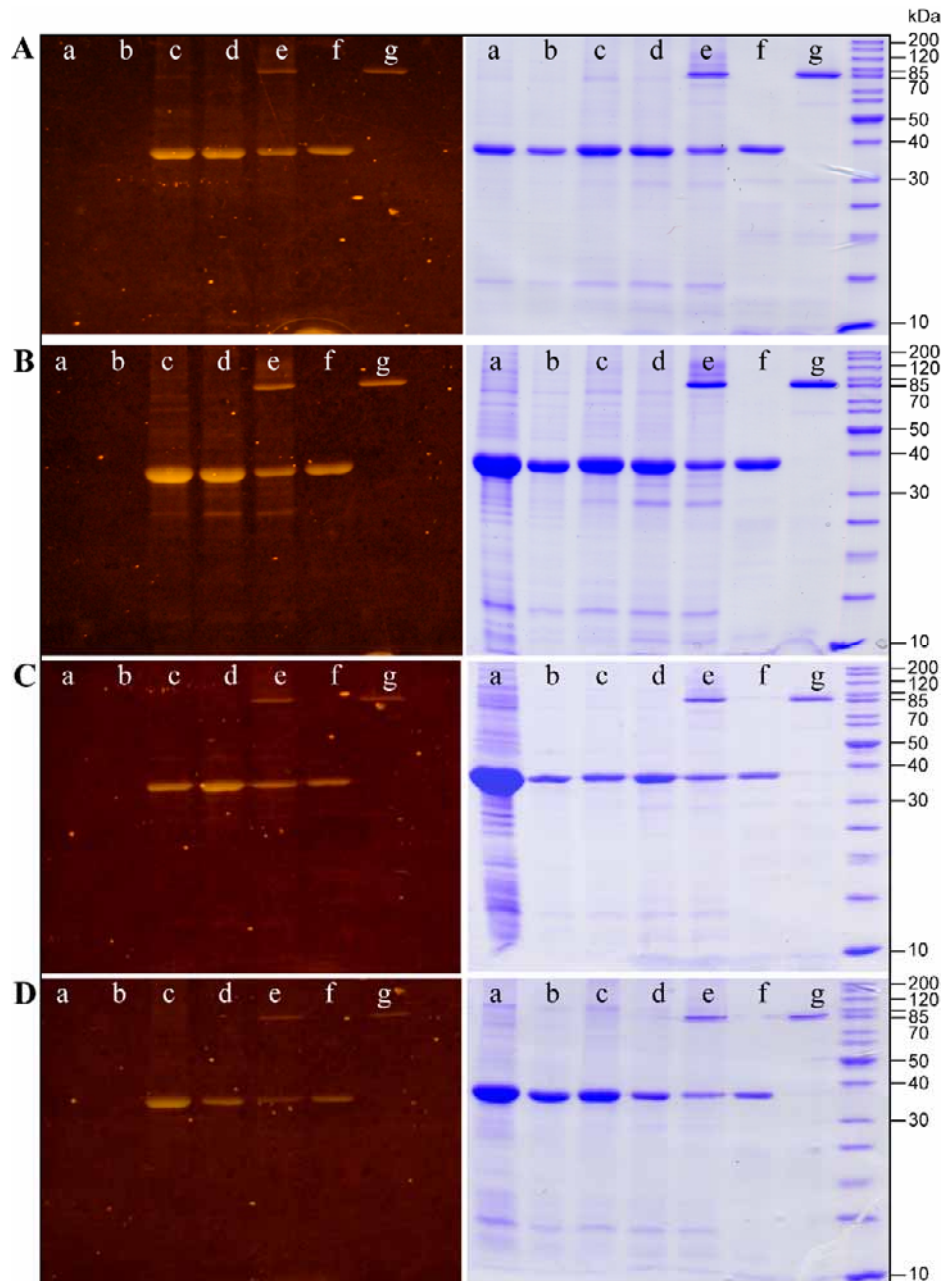


Abbildung 4.18: SDS-PAGE der durch S-Alkylierung mit **18** und [3+2]-Click-Reaktion mit **13** modifizierten OmpF-Cystein-Mutanten; links unter UV-Licht; rechts nach Coomassie-Anfärbung. (A) OmpF-K16C; a, Produkt der Labelingreaktion **29**; b: **29** nach Entsalzungssäule und Konzentration; c, Produkt der [3+2]-Click-Reaktion **30** nach Entsalzungssäule und Konzentration; d, Rückfaltung von **30**, denaturiert; e, Rückfaltung von **30**, nativ; f, Rückfaltung von **30** nach tryptischem Verdau, denaturiert; g, Rückfaltung von **30** nach tryptischem Verdau, nativ. Das Auftragsschema ist analog für: B) OmpF-E181C, C) OmpF-D221C und D) OmpF-Y226C.

Die quantitative Bestimmung erfolgte über HPLC-MS und ergab einen Reaktionsumsatz von ~93-100% (für Details der Analyse siehe Kapitel 7.1.4). Sämtliche Reaktionsschritte wurden unter denaturierten Bedingungen in 6 M bzw. 3 M Harnstoff durchgeführt. Die Abtrennung der überschüssigen Reaktanten und ein benötigter Pufferwechsel erfolgten mittels einer Entsalzungssäule. Die dadurch verdünnten Proben wurden auf die gewünschte Konzentration aufkonzentriert. Die so erhaltenen OmpF-Hybride konnten durch Verdünnung in DMPC/DDM-Vesikel in ähnlich guten Ausbeuten (50 – 60%) zurückgefaltet werden wie die vergleichbare native Referenz. Nach Zugabe von Trypsin konnte ungefaltetes Material sowie sonstige Verunreinigungen verdaut werden, durch eine SDS-PAGE-Extraktion wurden die Proben für die BLM-Messungen aufgereinigt und anschließend charakterisiert (siehe Kapitel 4.9.3.3).

In **Abb. 4.19 A** ist eine Negativkontrolle der [3+2]-Click-Reaktion zwischen dem mit **18** S-alkylierten OmpF-K16C und dem Dansyl-Azid **13** gezeigt. Anstelle des Kupfers wurde EDTA in den Reaktionsansatz hinzu gegeben, um eventuell enthaltenes Kupfer, das als Verunreinigungen z. B. im Harnstoff vorliegt, zu komplexieren. Wie gezeigt fluoresziert nur die Positiv-Probe der Reaktion, sodass die Anwesenheit des Kupfers wie erwartet essentiell ist.

Weitere Experimente zeigten, dass die [3+2]-Click-Reaktion nicht nur im denaturierten Zustand des Proteins, sondern auch im rückgefalteten nativen Zustand erfolgen kann (**Abb. 4.19 B**). Hierbei wurde der Linker **18** unter denaturierten Bedingungen durch S-Alkylierung angebracht, das Protein zurückgefaltet, und die [3+2]-Click-Reaktion unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Da jedoch die Reinigungsschritte effizienter durchzuführen sind, wenn das Protein denaturiert vorliegt, wurde dieser Reaktionsweg routinemäßig eingeschlagen.

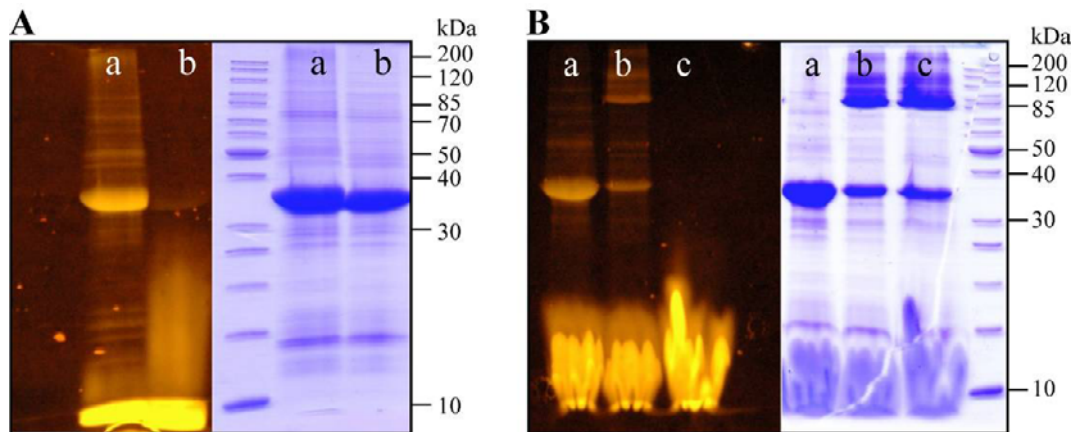


Abbildung 4.19: SDS-PAGE von [3+2]-Click-Reaktionen unter UV-Licht (links) und nach Coomassie-Anfärbung (rechts). (A) Negativ-Kontrolle an OmpF-K16C-**18+13**: a, 1.0 mM Kupfer; b, 1.0 mM EDTA, kein Kupfer zugegeben. (B) Reaktion von OmpF-K16C-**18+13** im rückgefalteten Zustand. a, Probe nach Rückfaltung für 5 min bei 95 °C erhitzt; b, Probe im nativen Zustand; c, Negativkontrolle der Reaktion durch Zugabe von EDTA anstelle von Kupfer.

4.7. Rückfaltungs- und Kontrollexperimente

Das bereits für OmpF bekannte Rückfaltungsprotokoll wurde in leicht modifizierter Form angewendet. Es stellte sich als sehr wichtig heraus, dass die OmpF *inclusion bodies* nach der Solubilisierung in Harnstoff vollständig gelöst vorlagen. Evtl. ungelöstes Material bereitete bei der Rückfaltung starke Probleme und musste daher vor Verdünnung in den Vesikelhaltigen Puffer durch Zentrifugation abgetrennt werden.

Generell wurden bei der Rückfaltung sehr gute Ausbeuten von bis zu 70% erzielt. Die Endkonzentration von OmpF in der Renaturierungslösung betrug hierbei maximal 100 μM , was eine drastische Erhöhung der Konzentration gegenüber dem Literaturprotokoll mit 2.8 μM darstellt.^[120] Trotz der erhöhten Konzentration wurden gute Rückfaltungsergebnisse erzielt, die eine Erzeugung größerer Mengen von OmpF-Hybriden ermöglichten, was für die Folgeschritte von Vorteil war. In Abb. 4.20 ist eine SDS-

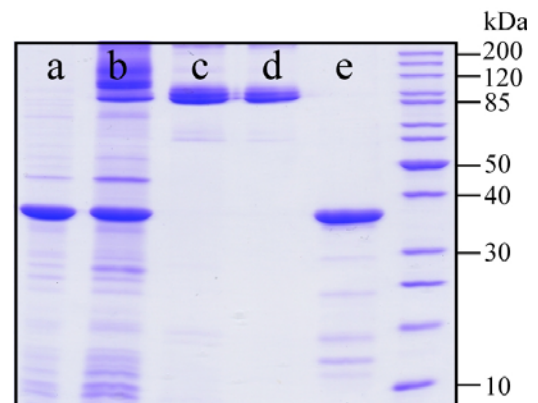


Abbildung 4.20: SDS-PAGE der Rückfaltung von OmpF-Wildtyp *inclusion bodies*. a, denaturiert; b, Rückfaltungsansatz mit einer Konzentration von 50 μM ; c, nach trypt. Verdau; d, nach IEX; e, Aufgereinigte Probe, Hitze-denaturiert.

PAGE der Rückfaltung und Aufreinigung von OmpF-Wildtyp *inclusion bodies* gezeigt. Aus

einem Rückfaltungsansatz von 14.8 mg (4 mL, 100 μ M) konnte eine Menge von 3.8 mg nach IEX, Konzentration und Dialyse gewonnen werden. Das entspricht einer Ausbeute von rund 26%. Ein typisches Chromatogramm der IEX ist in **Abb. 4.21** gezeigt. Die NaCl-Konzentration wurde innerhalb weniger CV erhöht, da die Verunreinigungen im Wasch-Schritt abgetrennt wurden und das Protein in konzentrierter Form von der Säule eluiert werden sollte.

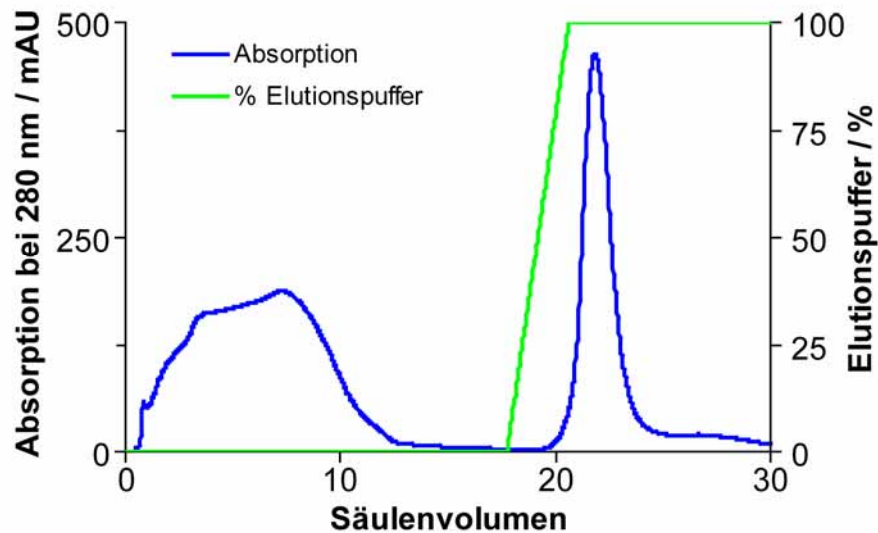


Abbildung 4.21: Erhaltenes Chromatogramm der IEX (HiTrap DEAE-Sepharose FF, 1 mL) von rückgefaltetem OmpF-Wildtyp nach tryptischem Verdau und Solubilisierung der Probe. Im Elutionspuffer sind 500 mM NaCl enthalten.

Die Rückfaltung der durch NCL erhaltenen Proteine **22** (nativ) und **23** (modifiziert durch K16II) ist in **Abb. 4.22** gezeigt. Wie bei den übrigen Rückfaltungen auch bildet sich eine scharfe Bande des trimeren OmpF erst nach tryptischem Verdau aus (Spuren d). Durch Ionenaustauscherchromatographie (**Abb. 4.23**) konnte der Rückfaltungsmix weiter aufgereinigt werden (Spur e). Nach Hitze-Denaturierung der Probe wird wieder die Doppelbande bei 34 kDa und 37 kDa, entsprechend des NCL-Produktes und der *inclusion bodies* **21**, sichtbar. Mittels verschiedener Methoden wurde versucht, das rückgefaltete trimere OmpF von dem C-terminalen Fragment abzutrennen. So wurde neben einer IEX (unter Verwendung des starken Ionentauschers ResourceQ und Elution mit sehr flachem Gradienten) eine Entsalzungssäule sowie die Verdünnung der Lösung in Puffer gefolgt von Aufkonzentrierung (MWCO 10 kDa) durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass beide Spezies nicht voneinander zu trennen waren. Daher wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um die NCL-Methode an OmpF prinzipiell zu verifizieren und um die Ursache der Existenz der Doppelbande zu erklären.

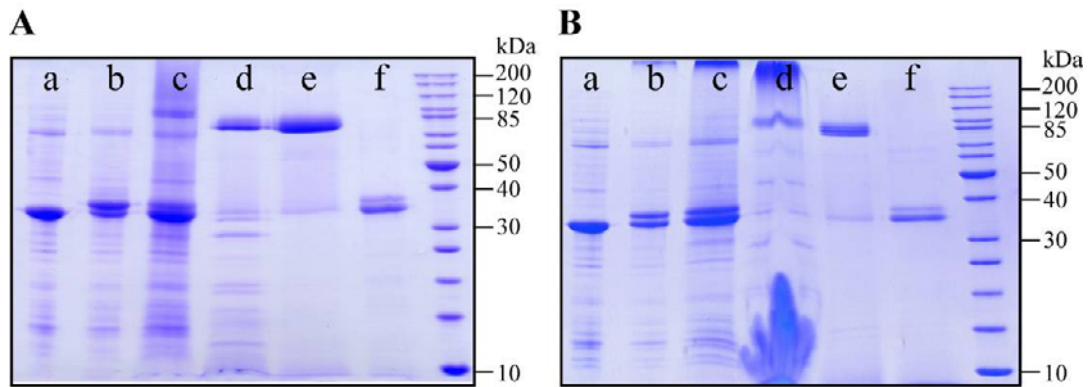


Abbildung 4.22: SDS-PAGE der Rückfaltung nach NCL. (A) Natives OmpF. a, *inclusion bodies* von OmpF-Δ(1-26)-N27C **21**; b, Produkt der NCL **22**; c, **22** nach Rückfaltung; d, **22** nach trypt. Verdau; e, **22** nach IEX, nativ; f, Probe e nach Hitze-Denaturierung. (B) Modifiziertes OmpF. a, *inclusion bodies* von **21**; b, NCL-Produkt **23**; c, **23** nach Rückfaltung; d, **23** nach trypt. Verdau; e, **23** nach IEX; f, Probe e nach Hitze-Denaturierung.

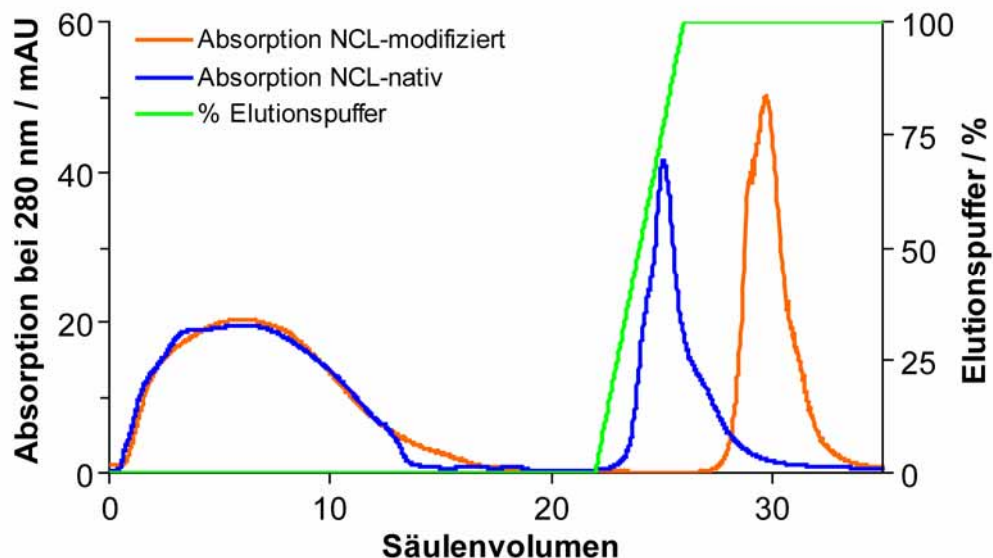


Abbildung 4.23: Chromatogramm der IEX (HiTrap DEAE-Sepharose FF, 1 mL) von beiden Ligationsprodukten: **22**, nativ (blaue UV-Spur); **23**, modifiziert (orangene UV-Spur). Der gezeigte Elutionsgradient bezieht sich auf das Chromatogramm des modifizierten NCL-Produktes; das native Produkt wurde ebenfalls bei 100% eluiert. Im Elutionspuffer sind 500 mM NaCl enthalten.

Diese Bande ist interessanter Weise nach Aufreinigung der Probe durch tryptischen Verdau noch enthalten und wird erst nach Hitze-Denaturierung sichtbar (Abb. 4.22, Spuren f). Sie entspricht nicht umgesetzten Edukt bei der NCL, dem OmpF-Deletionsfragment OmpF-Δ(1-26)-N27C **21** (Abb. 4.22, Spur f, untere Bande bei 34 kDa). Daher wurde getestet, ob dieses Fragment a) in der Lage ist, sich ohne das 26er-Peptidfragment zurückzufalten, oder b), ob die Rückfaltung in einem nicht-kovalent gebundenen Zustand mit dem Peptid möglich ist. Das Peptid bildet die Trimer-Grenzfläche und deckt den β-Strang 1 und 16 ab (Kapitel

4.4). Wie in **Abb. 4.24. A**, Spuren a & b gezeigt, ist das OmpF-Fragment **21** nicht in der Lage, sich zurückzufalten. Eine Addition des 26-er Peptids mit freiem Carboxy-Terminus änderte dieses Verhalten nicht (**Abb. 4.24 A**, Spuren c & d), was von der Notwendigkeit einer erfolgreichen NCL-Reaktion zur Erzeugung rückfaltungsfähiger OmpF-Hybride zeugt.

Um zu testen, ob die Existenz der 34 kDa-Bande eine Konsequenz der Aufreinigungsprozedur mittels proteolytischem Verdau ist, wurde die Referenzmutante N27C, die dem NCL-Produkt mit der nativen Sequenz entspricht, zurückgefaltet und tryptisch verdaut, um die Stabilität des semisynthetischen Biohybrids zu untersuchen (**Abb. 4.24 B**). Das Ergebnis demonstriert die Stabilität von OmpF-N27C gegenüber Trypsin. Auch nach 90 min und einer Inkubationstemperatur von 37 °C ist kein Proteinabbau zu beobachten.

Schließlich wurden gemischte Rückfaltungsansätze durchgeführt (**Abb. 4.24 C**). *Inclusion bodies* des nativen OmpF wurden mit dem OmpF- Δ (1-26)-N27C-Fragment in einem 1:1 Verhältnis miteinander gemischt und das 26er Peptid mit dem freien Carboxy-Terminus hinzugegeben. Nach tryptischem Verdau unter Standard-Bedingungen verbleibt das Fragment **21** noch immer in der Rückfaltungslösung, obwohl es nicht stabil gegenüber proteolytischem Verdau sein sollte, da es keine stabilen Trimere ausbilden kann. Weitere tryptische Verdauansätze dieser Probe nach Solubilisierung in octyl-POE führten zu gleichem Ergebnis (**Abb. 4.24 D**). Aus den erhaltenen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass diese Verunreinigung durch den Einbau in gemischte Detergenzmicellen geschützt ist und am trimeren und intakten OmpF anhaftet, was eine quantitative Abtrennung verhindert.

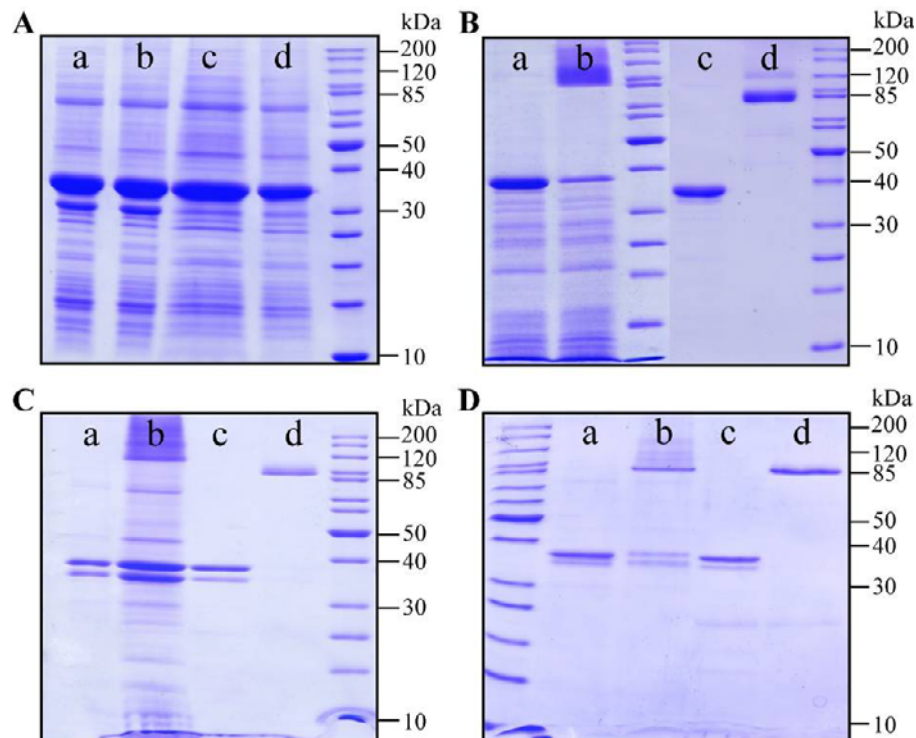


Abbildung 4.24: SDS-PAGE verschiedener Rückfaltungs-Kontroll-Experimente. **(A)** Rückfaltungsexperiment von OmpF- $\Delta(1-26)$ -N27C **21**. a, **21** nach Rückfaltung, Hitze-denaturiert; b, **21** nach Rückfaltung, nativ; c, **21** nach Rückfaltung & trypt. Verdau, denaturiert; d, **21** nach Rückfaltung & trypt. Verdau, nativ. **(B)** Tryptischer Verdau von rückgefaltetem OmpF-N27C. T = 0 min, a, denaturiert; b, nativ; T = 90 min, c, denaturiert; d, nativ. **(C)** Gemischte Rückfaltung von nativen OmpF *inclusion bodies* + OmpF- $\Delta(1-26)$ -N27C **21** + 26er Peptid als freie Säure. a, denaturiert, b, nativ; c, nach trypt. Verdau, denaturiert; d, nach trypt. Verdau, nativ. **(D)** Tryptischer Verdau der gemischten Rückfaltung nach Solubilisierung in 3% octyl-POE. a, Vergleichsprobe vor Solubilisierung, denaturiert; b, Vergleichsprobe, nativ; c, nach Solubilisierung, denaturiert; d, nach Solubilisierung, nativ.

4.8. 2-Punkt-Anknüpfungs-Experimente mit Bis-Maleimid-Linker

Das Problem bei einer 1-Punkt-Anknüpfung in der OmpF-Pore ist, dass die angeknüpften synthetischen Modulatoren in verschiedenen Konformationen vorliegen können. In Abhängigkeit der erhaltenen Orientierung kann der Stromfluss durch die Pore schwach oder stark moduliert werden, und heterogene Zustände innerhalb einer BLM-Messung sind möglich. Um Aussagen über die Orientierung geben zu können, ist eine Zeit- und Materialaufwendige Kristallstrukturanalyse erforderlich, die aber meist auch nur einen favorisierten Zustand widerspiegelt. Bei einer 2-Punkt-Anknüpfung innerhalb der OmpF-Pore sollten verschiedene Orientierungen ausgeschlossen sein und die Probe einen homogenen Zustand aufweisen.

Zur Anbringung von Modulatoren an zwei Punkten gibt es verschiedene Möglichkeiten: zum einen können über die NCL-Strategie funktionelle Gruppen in die N- bzw. C-terminalen Fragmente eingeführt werden, an denen die [3+2]-Click-Reaktion und/oder S-Alkylierung stattfinden kann. So können asymmetrische Modulatoren eingeführt werden. In einer symmetrischen Variante können in einer Additionsreaktion Thiole an Maleimide geknüpft werden. Reduzierte Thiol-Gruppen reagieren in einem pH-Bereich zwischen 6.5 – 7.5 effizient mit Maleimiden unter Bildung eines stabilen Thioethers. Grundsätzlich muss der synthetische Baustein eine geeignete Länge und Größe aufweisen, um effektiv an zwei Punkten innerhalb der Pore angebracht werden zu können. Diese *Crosslinking*-Reaktion muss im nativen zurückgefalteten Zustand erfolgen, damit nicht zwei voneinander unabhängige Proteine miteinander verknüpft werden. Für die Analytik stehen prinzipiell verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: die Probe kann denaturiert, tryptisch verdaut und mittels SDS-PAGE auf ein verändertes Fragmentmuster oder per Massenspektrometrie analysiert werden, um das verknüpfte Fragment zu detektieren; freie Cysteine können über das Ellmans-Reagenz^[147] quantifiziert werden; durch CD-Spektroskopie könnte ein stabilisierender Effekt, der sich durch eine höhere Schmelztemperatur äußert, gemessen werden. Auch ist es möglich, die Anwesenheit nicht-umgesetzter Cysteine durch das fluoreszierende Dansyl-Acetamid **19** qualitativ nachzuweisen.

In dieser Arbeit wurden die vier Cystein-Doppelmutanten K16C/G119, K16C/G120C, K16C/A123C und K16C/S125C hergestellt (**Abb. 4.25**). Alle vier konnten in Form von *inclusion bodies* rekombinant erzeugt und aufgereinigt werden.

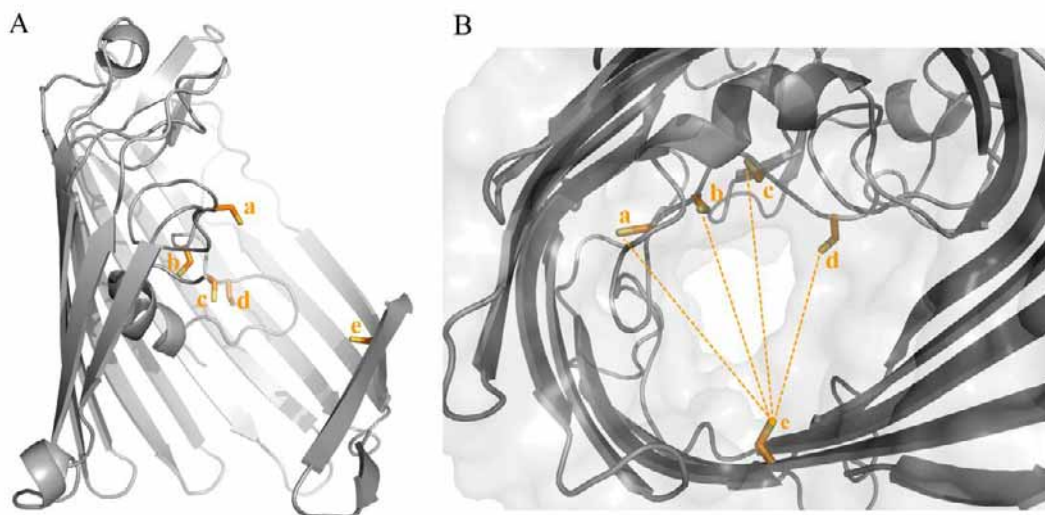
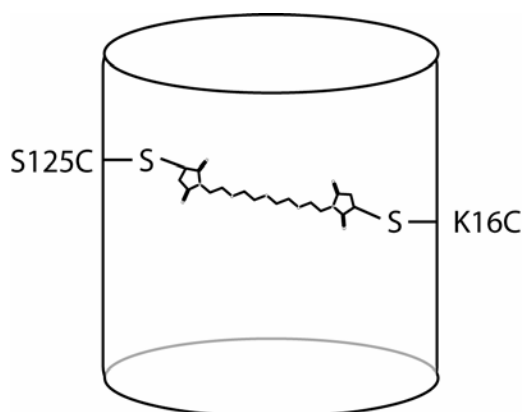


Abbildung 4.25: Ansicht auf die Anordnung der Cystein-Mutationen in der OmpF-Pore. **(A)** Seitenansicht, die Reste 20-100 wurden wegen der besseren Übersicht weggelassen. **(B)** Ansicht vom Boden hinein in die Pore, die Oberfläche ist in hellgrau dargestellt. a = S125C (17.8), b = A123C (15.9), c = G120C (18.9), d = G119C (15.9) und e = K16C, die Abstände beziehen sich auf den entsprechenden S-S-Atom-Abstand und sind in Å angegeben.

In ersten Testreaktionen wurde die S125C/K16C-Doppelmutante und als Referenz die K16C-Einzelmutante verwendet, um eine 2-Punkt-Anknüpfung mit dem Bis-Maleimid 1,11-Bis-Maleimidtriethylglykol **20** durchzuführen. Dieser Linker besitzt eine Länge von 17.8 Å und ist daher geeignet, um den Raum zwischen den beiden Thiol-Gruppen zu durchspannen (siehe **Abb. 4.25 B**; Abstand a-e = 17.8 Å; **Schema 4.5**). Nach erfolgter Reaktion und einer Inkubationsdauer von 3 h bzw. 16 h wurden die erhaltenen Proben analytisch untersucht. In **Abb. 4.26 A** ist die SDS-PAGE der 2-Punkt-Verknüpfungsreaktion gezeigt. Für ein Kontrollexperiment wurde der Reaktionsansatz



Schema 4.5: 2-Punkt-Anknüpfung von **20** an die K16C/S125C-Cystein-Doppelmutante

partiell mit dem Dansyl-Iodacetamid **19** umgesetzt. Aus der SDS-PAGE lässt sich folgern, dass es einen zumindest partiellen Reaktionsumsatz gab, da die Cysteine innerhalb der Pore nicht mit **19** S-alkyliert werden (Spur d bzw. h). Jedoch ist nicht auszuschließen, dass nach einer 1-Punkt-Anknüpfung der Raum innerhalb der Pore stark begrenzt und nicht für das Dansylderivat zugänglich ist. Das Laufverhalten der denaturierten OmpF-Spezies (Spur b) zeigt keine Änderung in der SDS-PAGE, wie im Falle einer beidseitigen Verknüpfung angenommen werden kann. In einem weiteren Kontroll-Experiment wurde die

S-Alkylierungsreaktion im denaturierten Zustand der Pore nach der 2-Punkt-Anknüpfungsreaktion durchgeführt, und wie in **Abb. 4.26 C** ersichtlich fluoreszieren die Banden entsprechend dem OmpF-Monomer bei 37 kDa, sowohl bei der Kontrolle der Einfachmutante (Spur a und b), als auch bei der Doppelmutante (Spur c und d). Folglich muss von einem bestenfalls nicht quantitativen Umsatz ausgegangen werden. Diese Experimente wurden ebenfalls mit den beiden Doppelmutanten K16C/G119C und K16C/G120C, die einen kleineren bzw. größeren S-S-Atom-Abstand aufweisen (siehe **Abb. 4.25**), durchgeführt, lieferten aber kein anderes Ergebnis.

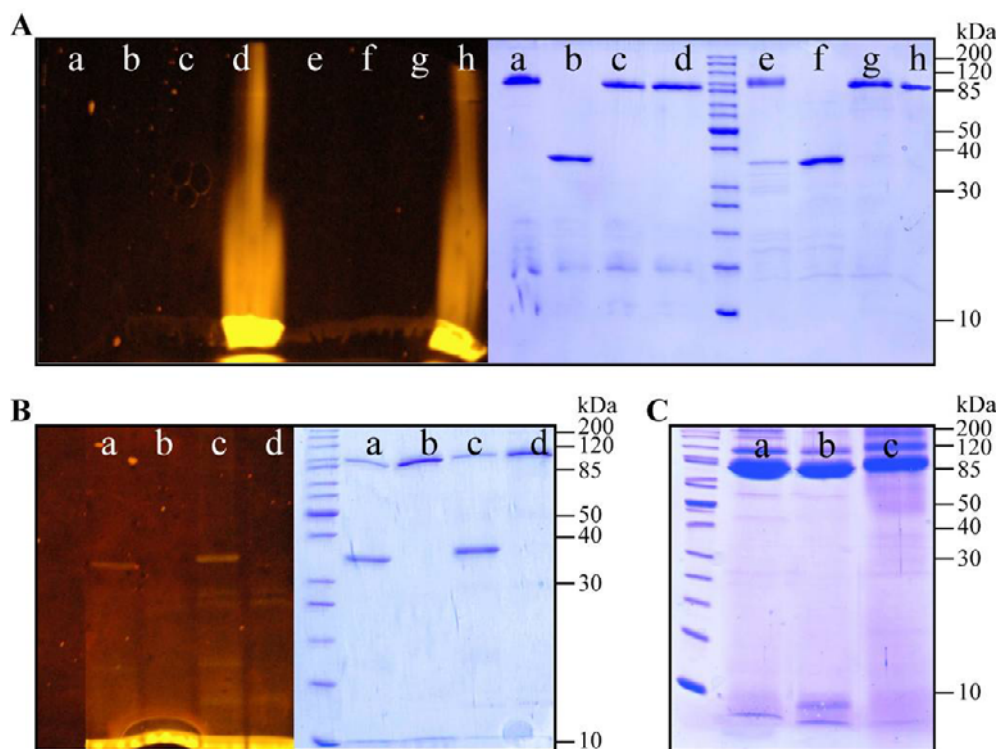


Abbildung 4.26: SDS-PAGE unter UV-Licht (links) und nach Coomassie-Anfärbung (rechts) der 2-Punkt-Anknüpfung mit BM(PEG)₃. (A) a-d, OmpF-K16C, e-h, OmpF-K16C/S125C. a/e, zurückgefaltete Referenz; b/f, nach Verknüpfungsreaktion, denaturiert; c/g, nach Verknüpfungsreaktion, nativ; d/h, nach Kontrolleexperiment mit Dansyl-Iodacetamid **19**. (B) Kontroll-Experiment nach 2-Punkt-Anknüpfung mit **20** im denaturierten (a, c) und nativen (b, d) Zustand. Spuren a/b entsprechen OmpF-K16C-BM(PEG)₃; c/d dem OmpF-K16C/S125C-BM(PEG)₃. (C) Proben nach Ionenaustauscherchromatographie und Aufkonzentrierung. a, OmpF-K16C; b, OmpF-K16C-BM(PEG)₃; c, OmpF-K16C/S125C-BM(PEG)₃

Um das Reaktionsprodukt nachzuweisen wurden verschiedene Methoden angewendet. Für eine massenspektrometrische Analyse musste das Detergenz vor der Messung entfernt werden. Hierfür wurden BioBeads zu dem Reaktionsmix zugegeben, die Lösung zentrifugiert und zu dem erhaltenen Überstand wurde Trypsin hinzugegeben. Die Analyse blieb jedoch ohne Erfolg, da das gewünschte Fragment nicht detektiert werden konnte.

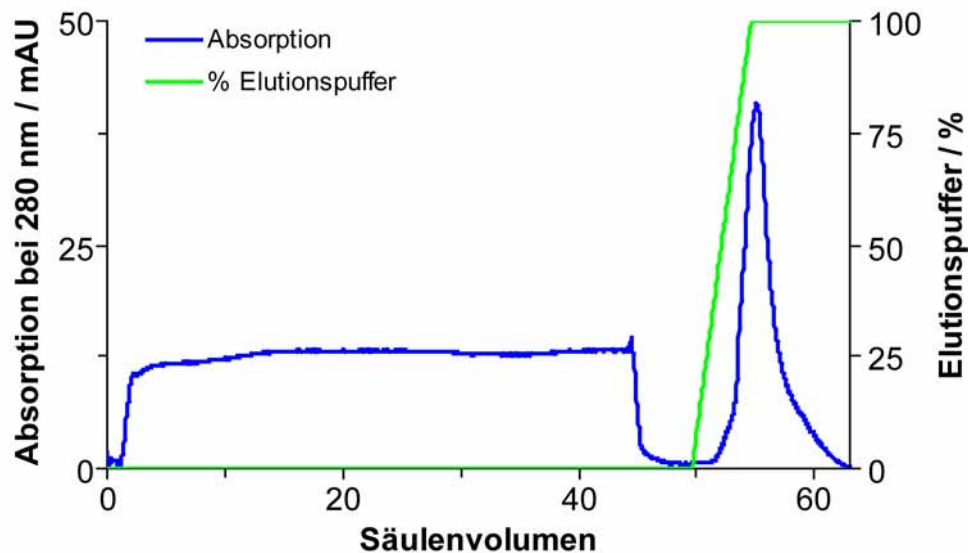


Abbildung 4.27: Erhaltenes Chromatogramm der IEX (HiTrap DEAE-Sepharose FF, 1 mL) von OmpF-K16C/S125C-BM(PEG)₃ nach tryptischem Verdau. Der Auftrag der auf 40 mL verdünnten Probe wurde mittels Peristaltik-Pumpe durchgeführt. Im Elutionspuffer sind 500 mM NaCl enthalten.

Von den IEX-gereinigten Proben (SDS-PAGE: **Abb. 4.26 C**; Chromatogramm: **Abb. 4.27**) wurde ein CD-Absorptionsspektrum zwischen 200 und 260 nm aufgenommen (**Abb. 4.28 A**). Die Proben lagen solubilisiert in 0.5% octyl-POE mit einer Konzentration von 5 μ M vor. Es zeigte sich, dass das Detergenz octyl-POE unter 200 nm Störungen verursachte. Die erhaltenen Kurven zeigten einen ähnlichen Verlauf wie das aus der Literatur erhaltene Spektrum des rückgefalteten OmpF (**Abb. 4.28 B**). Bei einer Wellenlänge von 216 nm, bei der eine Signaländerung der Elliptizität aufgrund von strukturellen Veränderungen beim Erhitzen der Probe größtmöglich war, wurde eine Schmelzkurve zwischen 20 und 95 °C und *vice versa* aufgenommen. Aus den erhaltenen Schmelzkurven konnte kein signifikanter Trend einer Schmelzpunktverschiebung zwischen der Referenz und dem unter **Schema 4.5** gezeigten Produkt bestimmt werden.

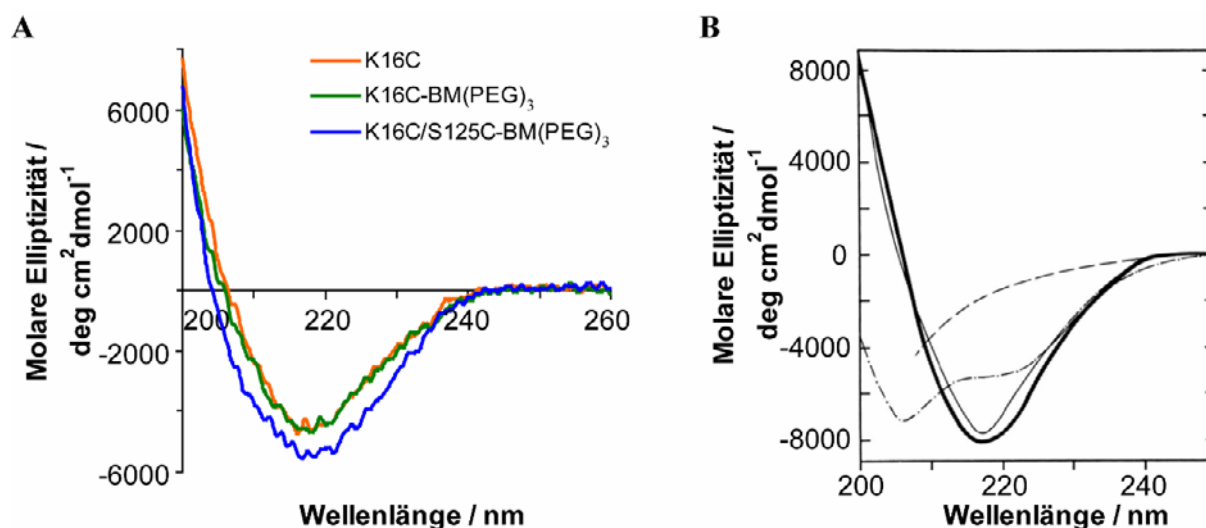


Abbildung 4.28: Wellenlängenspektren von OmpF. (A) Spektrum von 200 bis 260 nm der OmpF-K16C-Cysteinmutante (orange), umgesetzt mit Bis-Maleimid **20** (grün) und die Doppelmutante OmpF-K16C/S125C umgesetzt mit **20**. Die Probenkonzentration betrug 5 μM (in 0.5% octyl-POE, 250 mM NaCl, 5 mM Kalium-Phosphat; pH 7.3), die verwendete Küvette hatte eine Schichtdicke von 0.1 cm. (B) Aus der Literatur entnommenes Referenz-CD-Spektrum als Vergleich. OmpF-Wildtyp (—), denaturiert in SDS (---), denaturiert in 6 M Guanidinium-Chlorid (— · —) und nach Rückfaltung (— · —).^[148]

Zusammenfassend lassen die hier gezeigten Experimente zur 2-Punkt-Anknüpfung an eine OmpF-Doppelcysteinmutante mit einem homobifunktionalen symmetrischen Maleimid darauf schließen, dass die Reaktion unter den gegebenen Bedingungen nicht realisiert werden konnte. Zusätzliche Experimente mit weiteren synthetischen bifunktionalen Crosslinker-Bausteinen sind nötig, um eine 2-Punkt-Anknüpfung zu erzielen. Dabei sind die prinzipiellen Schwierigkeiten wie z. B. die korrekte Orientierung des Crosslinkers zu überwinden, die diese Reaktion mit sich bringt.

4.9. Funktionelle Charakterisierung hybrider OmpF-Poren

Mittels der *Black Lipid Membrane*-Methode wurden die in dieser Arbeit erzeugten hybriden OmpF-Kanäle sowie deren Referenz-Verbindungen in einem Messbereich von -160 mV bis +160 mV vermessen. Die Werte einer Messspannung wurden gemittelt und durch lineare Regression wurde der Leitfähigkeitswert bestimmt. Der Vorteil dieser Bestimmungsmethode ist das Einfließen einer hohen Datenpunktezahls in die Auswertung. Desweiteren wurde bei einer Salzkonzentration von 150 mM gemessen. Bei dieser Konzentration liegt der Fokus der Messungen im Wesentlichen auf einer Blockade der Pore und nicht auf elektrostatischen Effekten, die durch die Einführung von synthetischen Modulatoren in die Pore hinein verursacht werden können.^[149]

4.9.1. Leitfähigkeitsmessungen an membran-extrahiertem und rückgefaltetem OmpF

Für das aus der Membran extrahierte Wildtyp OmpF wurde anhand der in **Abb. 4.29 A** gezeigten I/U-Kurve ein Leitfähigkeitswert von 0.99 ± 0.02 nS bestimmt. Die einzelnen Messpunkte weisen pro Spannungswert eine Abweichung auf, die OmpF-typisch ist und ebenfalls in der Literatur beobachtet wurde.^[150] Der von Baslé *et al.* unter vergleichbaren Bedingungen gemessene Leitfähigkeitswert von 0.93 ± 0.19 nS stimmt dem hier gemessenen gut überein.^[150]

Die elektrophysiologische Charakterisierung des aus *inclusion bodies* zurückgefalteten Wildtyp OmpF ist in **Abb. 4.29 B** dargestellt. Auffallend ist die stärkere Streuung der Datenpunkte, die bei einer Spannung von ± 160 mV deutlich wird. Der hier bestimmte Wert von 0.87 ± 0.02 liegt um -11% niedriger als der des Membran-extrahierten OmpF, weist aber durchaus dieselbe Größenordnung auf und liegt innerhalb des in der Literatur angegebenen Bereichs (s. o., 0.74 nS – 1.12 nS).

Die geringfügigen Unterschiede in den bestimmten Leitfähigkeiten könnten durch Membran-extrahierten OmpF anhaftende endogene *E. coli*-Lipide verursacht worden sein. Dieser Umstand lässt sich auch unter Verwendung des gleichen Protokolls zur Probenpräparation über eine SDS-PAGE-Extraktion nicht ändern.

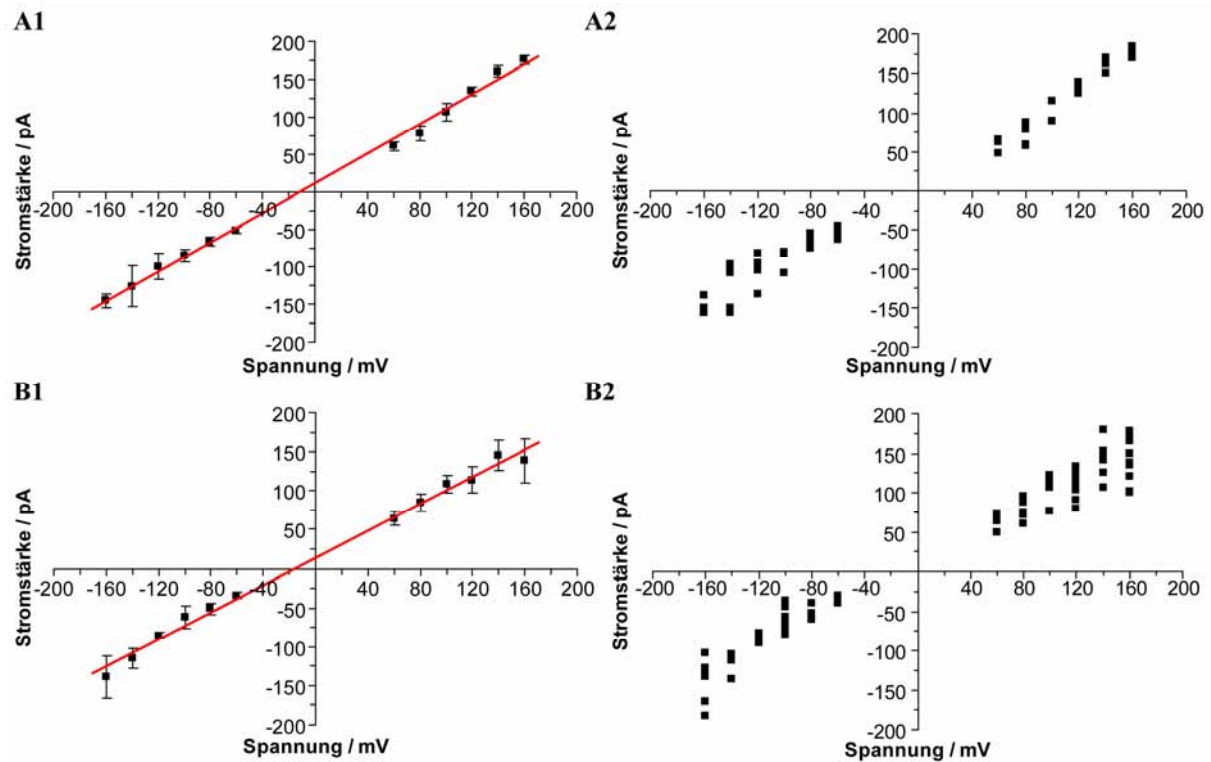


Abbildung 4.29: U/I-Abhängigkeit des (A) Membran-extrahierten OmpF und des (B) rückgefalteten OmpF-Wildtyps. Unter 1 ist die lineare Regression, unter 2 die Verteilung der gemessenen Datenpunkte gezeigt.

4.9.2. Leitfähigkeitsmessungen an OmpF-Referenz-Molekülen zur NCL und S-Alkylierung

Bei den durch NCL erzeugten semisynthetischen Ionenkanälen ist die Einführung eines Cysteins unabdingbar. Daher wurde an Position 27 Asparagin durch Cystein ersetzt. Diese Mutation befindet sich in der Schleife L1, der die β -Stränge 1 und 2 miteinander verbindet, und wurde so gewählt, damit es möglichst zu keiner signifikanten Änderung der Leitfähigkeit kommt. Um dies experimentell zu bestätigen, wurde die Cystein-Mutante in Form von *inclusion bodies* generiert und das Protein zurückgefaltet. In **Abb. 4.30 A1** ist die I/U-Kurve gezeigt. Bemerkenswert ist die geringe Streuung der einzelnen Trimer-Öffnungen (**Abb. 4.30 A2**). Aus der erhaltenen Regressionsgerade wurde ein Leitfähigkeitswert von 0.91 ± 0.02 nS bestimmt, der vergleichbar mit dem nativen, rückgefalteten Protein ist (Abweichung +5%).

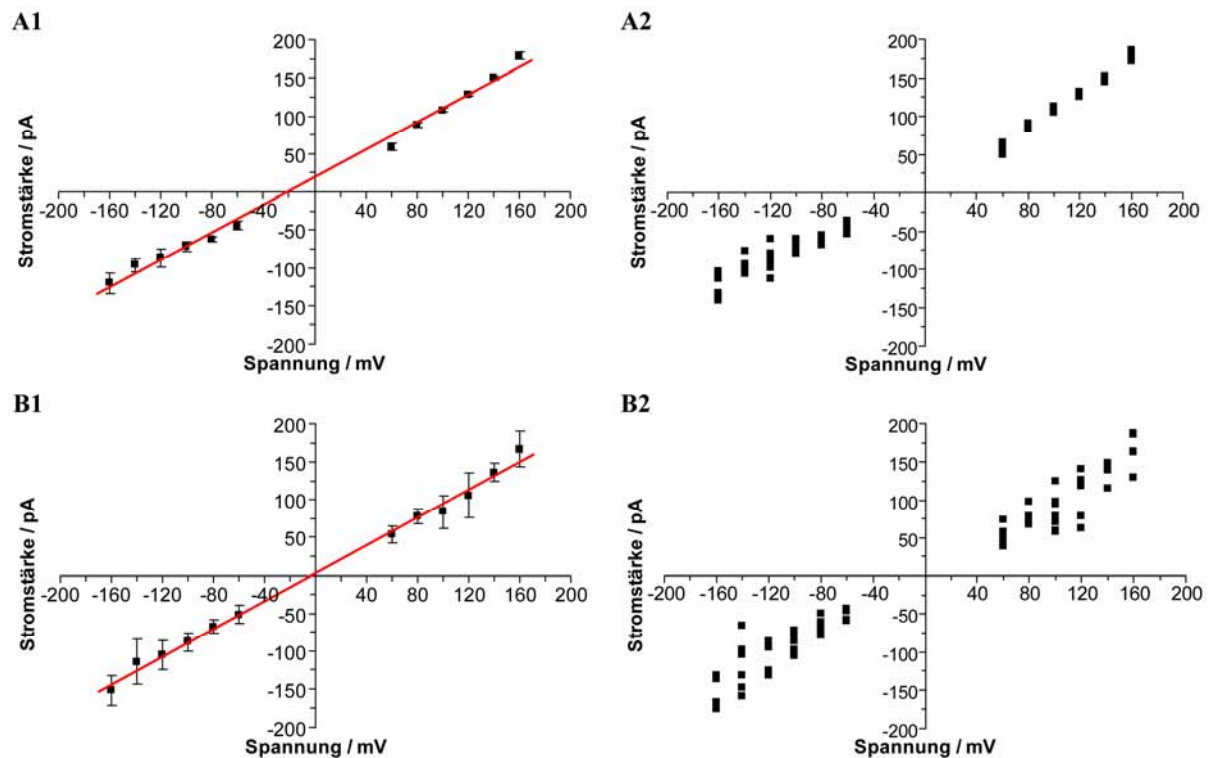


Abbildung 4.30: I/U-Abhängigkeit der (A) N27C-Referenzmutante für die NCL-Reaktion und (B) der K16C-Referenzmutante für die S-Alkylierungsreaktion. Unter 1 ist die lineare Regression, unter 2 die Verteilung der gemessenen Datenpunkte gezeigt.

Für die S-Alkylierungsreaktion wurde ein Cystein u. a. an Position 16 eingeführt. Bei dieser Art der Reaktion, die meist quantitativ erfolgte (siehe Kapitel 7), ist der größte Anteil der Cysteine umgesetzt. Dennoch wurde die K16C-Mutante funktionell charakterisiert, um evtl. auftretende Effekte von nicht umgesetzten Cysteinen zu bestimmen. Die eingeführte Mutation hat keinen Effekt auf die Leitfähigkeit (**Abb. 4.30 B**) aufwies. Der aus der I/U-Kurve ermittelte Wert beträgt 0.92 ± 0.02 nS und ist somit vergleichbar mit dem Wert für das rückgefaltete Wildtyp OmpF (+6% Abweichung). Jedoch zeigte diese Referenzprobe eine stärkere Streuung der Messwerte als die N27C-Mutante. Verglichen mit anderen I/U-Kurven ist diese Streuung aber nicht untypisch für OmpF.

Als weitere Referenzverbindung wurde das durch NCL semisynthetisch erzeugte OmpF-N27C funktionell charakterisiert (**Abb. 4.31**). Es wurde ein Leitfähigkeitswert von 0.89 ± 0.02 nS (+2%) gemessen, der zwischen dem für die native Referenzverbindung und die Cysteinreferenz ermittelten Wert liegt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die NCL eine valide Methode zur Erzeugung naturidentischer Hybride darstellt.

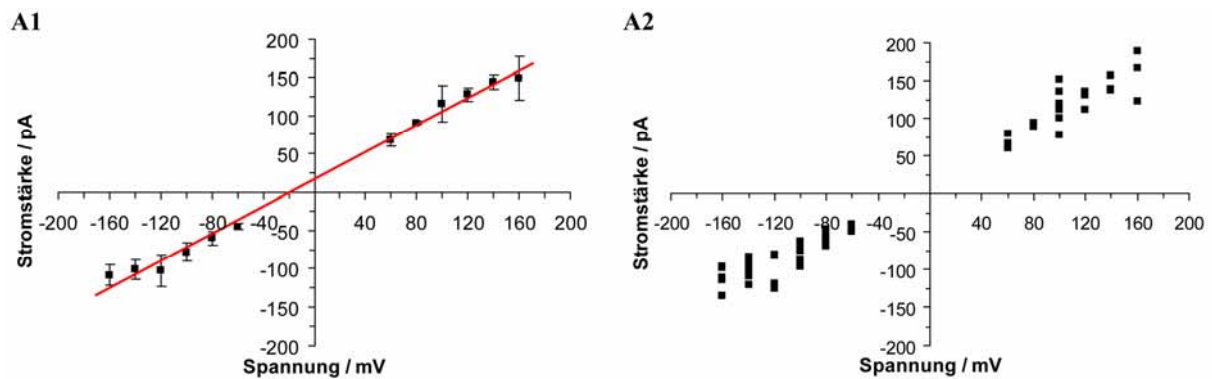
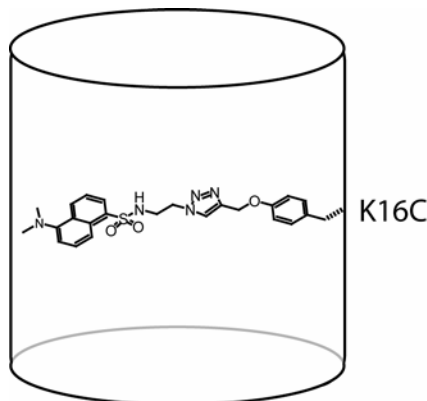


Abbildung 4.31: I/U-Kurven des durch NCL semisynthetisch hergestellten nativen OmpF **22**. Dieses Protein besitzt die für die NCL benötigte N27C-Mutation. Unter 1 ist die lineare Regression, unter 2 die Verteilung der gemessenen Datenpunkte gezeigt.

4.9.3. Leitfähigkeitsmessungen an hybriden OmpF-Kanälen, erzeugt durch...

4.9.3.1. ...Native Chemische Ligation kombiniert mit [3+2]-Click-Reaktion

Gemäß **Schema 4.4** sind zwei Routen zur Erzeugung hybrider OmpF-Poren möglich, bei denen NCL und [3+2]-Click-Reaktion in unterschiedlicher Reihenfolge miteinander



Schema 4.6: Schematische Ansicht auf die hybride OmpF-Verbindung **28**.

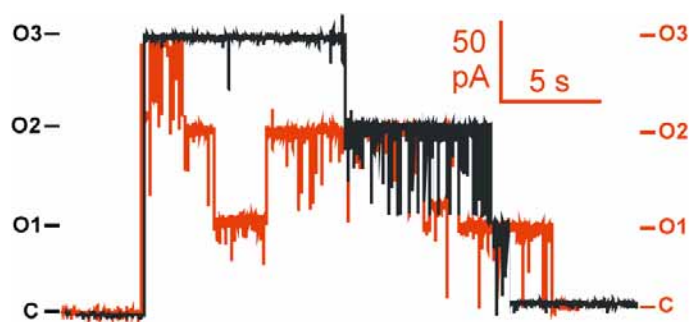


Abbildung 4.32: Messspuren des Trimer-Schließereignisses verglichen zwischen Wildtyp (schwarz) und dem über Route a) erzeugten OmpF-Hybrid **28** (rot). Die Messungen wurden bei einer Spannung von +140 mV durchgeführt, die Zahlen links und rechts der Spuren entsprechen der Zahl der offenen Monomere.

kombiniert werden. Route a) stellt die [3+2]-Click-Reaktion vor die NCL, und Route b) kombiniert beide Methoden in umgekehrter Reihenfolge. Beide Routen wurden angewendet, um die hybride OmpF-Verbindung **28** zu erzeugen (siehe **Schema 4.6**). Ein typisches Ereignis während einer BLM-Messung, bei dem ein Trimer in die Membran insertiert, sich öffnet, und nacheinander alle Monomeruntereinheiten schließen, ist in **Abb. 4.32** in

Vergleich mit dem Wildtyp dargestellt. **Abb. 4.33** stellt die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung beider Hybride dar. Die Verbindungen verhalten sich in etwa gleich und liefern mit 0.93 ± 0.04 nS (Route a)) und 0.90 ± 0.05 nS (Route b)) Leitfähigkeitswerte, die im Bereich der unmodifizierten Referenzen sind (Abweichung: +4% bzw. +1%). Im positiven Potentialbereich ist eine Linearität zwischen Spannung und Stromstärke gegeben, während im negativen Potentialbereich von -120 bis -160 mV deutliche Abweichungen auftreten. Die Ursache für dieses Verhalten lässt sich nur schwer aufklären. Möglicherweise spielen sterische Interferenzen der eingeführten Gruppe mit der Schleifenregion L3 eine Rolle, die abhängig von der Flussrichtung der Ionen sind. Dieser Erklärungsansatz ist aber nur dann sinnvoll, wenn OmpF sich nur in einer bestimmten Vorzugsrichtung in die Membran einlagert, was in der Literatur berichtet wurde.^[151] Um weniger spekulative Aussagen über die relative Orientierung der synthetischen Modulatoren geben zu können, wäre eine strukturelle Untersuchung dieser hybriden OmpF-Poren nötig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht an diesem Hybrid durchgeführt wurde.

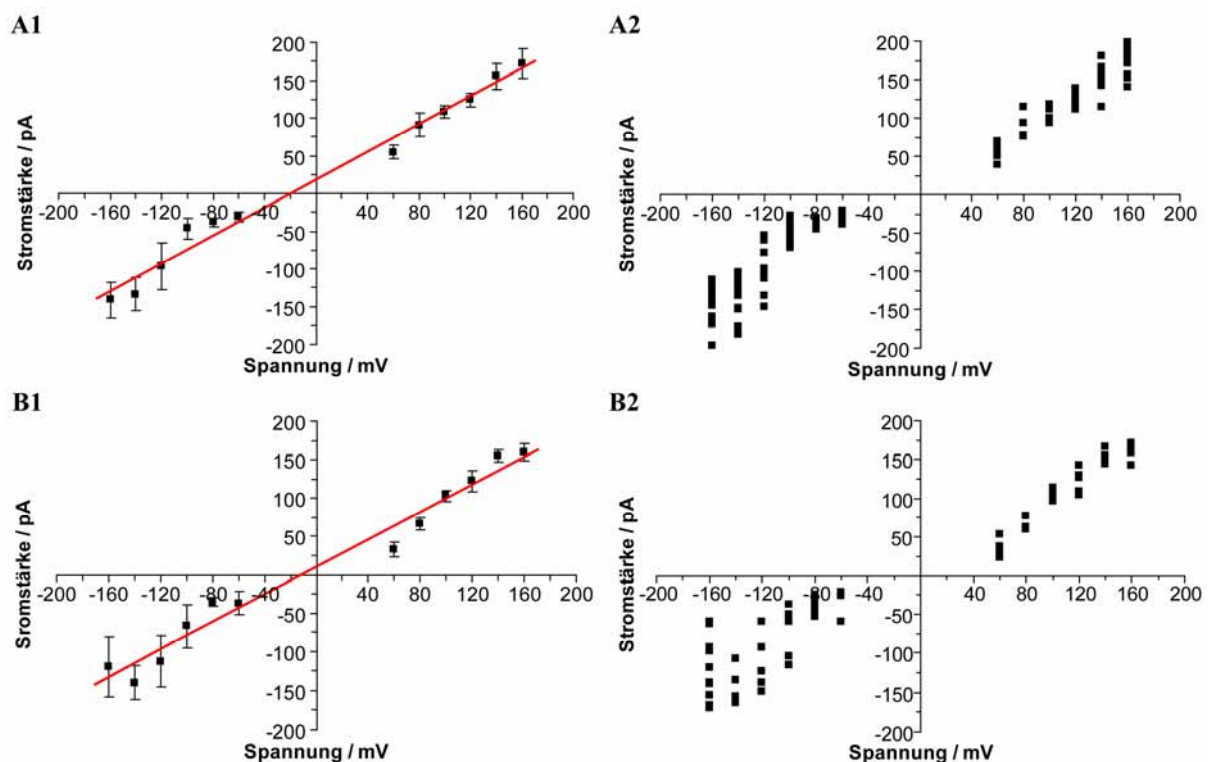


Abbildung 4.33: I/U-Kurven der hybriden OmpF-Pore **28**, erzeugt durch NCL und [3+2]-Click-Reaktion. (A) In Route a) wird das Click-Produkt in der NCL eingesetzt. (B) In Route b) wird die NCL vor die Click-Reaktion gestellt. Unter 1 ist die lineare Regression, unter 2 die Verteilung der gemessenen Datenpunkte gezeigt.

4.9.3.2. ...S-Alkylierung an der K16C-Cystein-Mutante

Durch die S-Alkylierungsreaktion wurden zwei verschiedene Verbindungen über ein Iodacetamid an Cys16 angeknüpft: die Dibenzo-18-Krone-6 **17** und das als Reportergruppe fungierende Dansyl-Derivat **19**. In **Abb. 4.34** sind die I/U-Abhängigkeiten der Messungen dargestellt. Beide Hybride zeigten eine starke Streuung der gemessenen Leitfähigkeiten, was auf eine zumindest partielle Blockade der Pore schließen lässt.

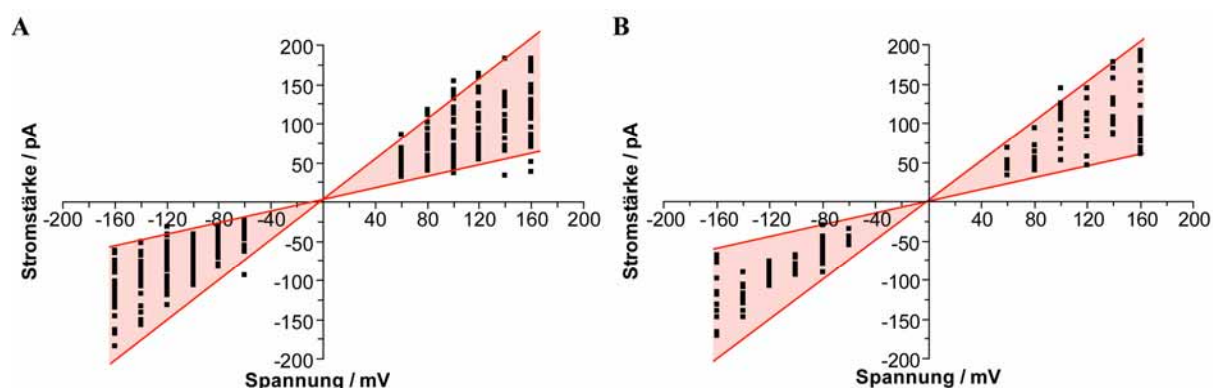


Abbildung 4.34: I/U-Kurven hybrider OmpF-Kanäle, erzeugt durch S-Alkylierung. (A) OmpF-Cys16-17. (B) OmpF-Cys16-20.

Für OmpF-Cys16-**17** wurde eine gemittelte Leitfähigkeit von 0.75 ± 0.01 nS gemessen, die minimale bzw. maximale Leitfähigkeit beträgt 0.42 ± 0.01 nS (-54%) und 1.14 ± 0.02 nS (+24%). Dies entspricht einer Reduktion der gemittelten Leitfähigkeit von -19% gegenüber der Referenzverbindung, eine Beispielspur der BLM-Messung ist in Vergleich mit dem Wildtyp in **Abb. 4.35 A** gezeigt. Durch eine röntgenkristallographische Untersuchung konnte diese Verbindung strukturell charakterisiert werden. Die Orientierung der Dibenzo-18-Krone-6 in der Pore wurde anhand dieser Kristallstruktur bestimmt. Eine Diskussion der beobachteten heterogenen Leitfähigkeiten ist auf Grundlage der strukturellen Daten in Kapitel 5.3.2 zu finden.

Für das Dansyl-modifizierte OmpF wurde eine gemittelte Leitfähigkeit von 0.78 ± 0.02 nS entsprechend einer Reduktion von -16% gemessen. Die minimale Leitfähigkeit beträgt 0.56 ± 0.02 nS (-39%), und die maximale Leitfähigkeit 1.10 ± 0.02 nS (+20%). Diese Probe weist interessanterweise eine Blockade der Pore auf, während das über NCL und [3+2]-Click-Chemie eingeführte Dansyl-Derivat diesen Effekt nicht aufweist (siehe vorangestelltes Kapitel, Diskussion der Ergebnisse in Kapitel 5.3.3).

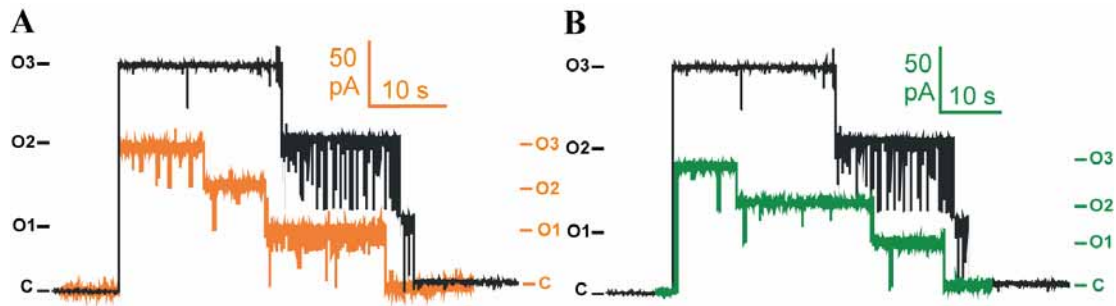


Abbildung 4.35: Beispielhafte Messspuren von Trimer-Schließereignissen verglichen zwischen Wildtyp (schwarz) und Hybrid. (A) OmpF-Cys16-17 (orange) und (B) OmpF-Cys16-19. Die Messungen wurden bei einer Spannung von +140 mV durchgeführt, die Zahlen links und rechts der Spuren entsprechen der Zahl der offenen Monomere.

4.9.3.3. ...S-Alkylierung und [3+2]-Click-Reaktion an vier verschiedenen Cystein-Mutanten

Da die Referenzmutante K16C keine signifikante Abweichung in der Leitfähigkeit gegenüber dem nativen OmpF aufwies, wurden die Referenzverbindungen für die verwendete E181C-, D221C- und Y226C-Mutante nicht vermessen.

An diesen vier OmpF-Cystein-Mutanten wurde durch S-Alkylierung der Iodacetamid-Alkin-Linker **18** angebracht. In der darauf folgenden [3+2]-Click-Reaktion wurde das Dansyl-Azid **13** in die OmpF-Pore eingeführt. Mittels der elektrophysiologischen Charakterisierung sollte getestet werden, ob ein ortsspezifischer Effekt der Anknüpfung gegeben ist.

Es wurden unterschiedliche Ergebnisse erhalten: bei der Anknüpfung an Cys16 und Cys221 wurde wie bei den in Kapitel 4.9.3.2 gezeigten Messungen mit der Dibenzo-18-Krone-6 eine breite Verteilung der Leitfähigkeiten beobachtet (Abb. 4.36). In Abb. 4.37 sind Beispielspuren in Vergleich zu Wildtyp OmpF gezeigt. Für die Verbindung Cys16-**18-13** wurde eine gemittelte Leitfähigkeit von 0.81 ± 0.02 nS gemessen. Das entspricht einer Abweichung von -12% gegenüber der K16C-Referenz. Die limitierenden Leitfähigkeiten wurden mit einem Minimalwert von 0.50 ± 0.01 nS (-56%) und einem Maximalwert von 1.14 ± 0.02 nS (+24%) bestimmt.

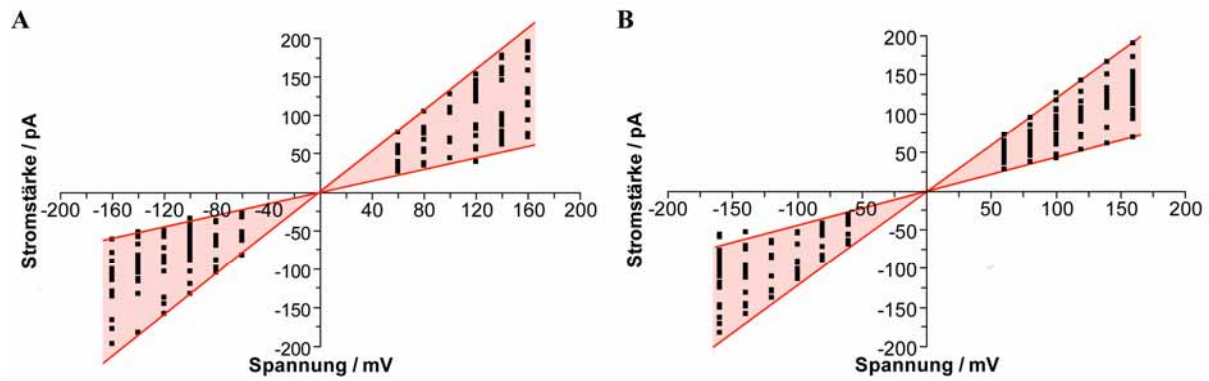


Abbildung 4.36: Verteilung der Leitfähigkeiten für (A) OmpF-Cys16-18-13 und (B) OmpF-Cys221-18-13.

Die hybride OmpF-Pore Cys221-18-13 weist einen Leitfähigkeitswert von 0.78 ± 0.01 nS und damit eine Reduktion von -15% gegenüber der Referenz auf. Die erhaltenen Grenzwerte der Leitfähigkeit von 0.53 ± 0.01 nS (-42%) und 1.05 ± 0.01 nS (+14%) liegen in etwa wie die bei Cys16-18-13.

Beide hybride OmpF-Poren weisen die bereits genannte Heterogenität auf, die wahrscheinlich auf unterschiedlich begünstigte Konformationen des Modulators zurückzuführen ist (siehe Kapitel 5.3.4).

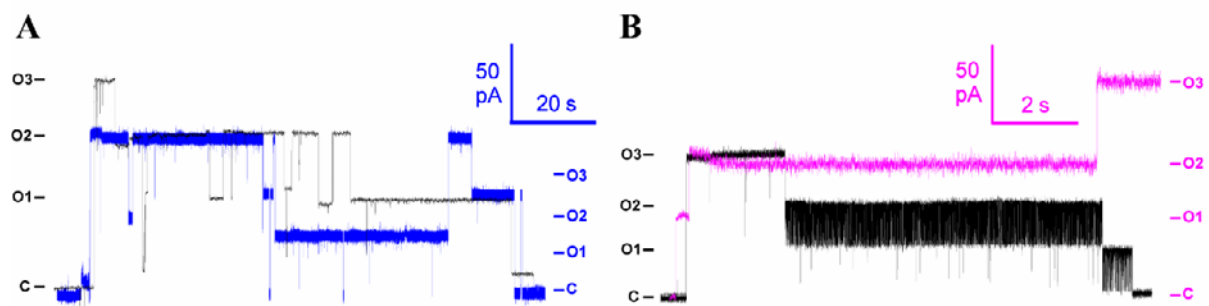


Abbildung 4.37: Beispielhafte Messspuren von Trimer-Ereignissen verglichen zwischen Wildtyp OmpF (schwarz) und Hybrid. (A) OmpF-Cys16-18-13 (blau) und (B) OmpF-Cys221-18-13 (magenta). Die dargestellten Messungen wurden bei einer Spannung von +120 mV (A) bzw. +100 mV (B) durchgeführt. Die Zahlen links und rechts der Spuren entsprechen der Zahl der offenen Monomere.

Interessanterweise zeigen die beiden Hybride Cys181-18-13 und C226-18-13 keine breite Verteilung der Leitfähigkeiten, sondern eine für OmpF übliche Verteilung (Abb. 4.38). Über den S-S-Atomabstand zwischen den Cystein-Resten sind die erhaltenen Ergebnisse alleine nicht zu erklären, da die S-Atomabstände von Cys181 8.3 Å und von Cys226 4.9 Å bezogen auf Cys221-S γ betragen.

Die gemittelte Leitfähigkeit für Cys181-18-13 hat mit 0.84 ± 0.01 nS eine deutlich geringere Abweichung mit -9% als die für Cys226-18-13 mit 0.76 ± 0.01 nS ermittelte Abweichung von

-17%, bezogen auf die K16C-Referenzmutante. Möglicherweise ist bei letzterem Hybrid ein Zustand favorisiert, der durch elektrostatische Wechselwirkungen mit sauren und basischen Resten von OmpF oder durch sterische Interferenzen mit der Schleife L3 einen zumindest teilweise geblockten Ionendurchtrittsweg hervorruft.

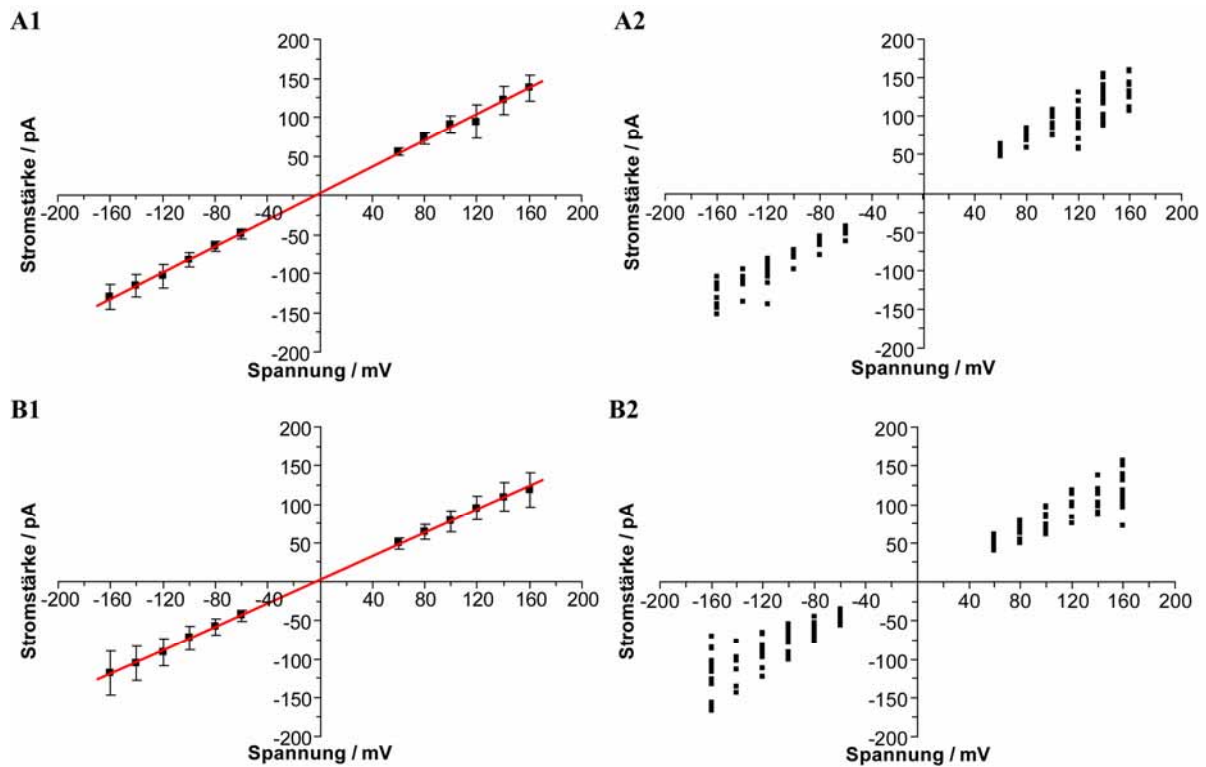


Abbildung 4.38: I/U-Kurven für (A) OmpF-Cys181-18-13 und (B) OmpF-Cys226-18-13. Unter 1 ist die lineare Regression, unter 2 die Verteilung der gemessenen Datenpunkte gezeigt.

4.9.4. Tabellarische Übersicht der gemessenen Leitfähigkeiten

Die folgende **Tabelle 4.4** gibt sämtliche ermittelten Leitfähigkeitswerte übersichtlich wieder:

Nr.	Protein	Leitfähigkeit / nS	± Fehler / nS	Prozentuale Abweichung vgl. mit Referenz [Nr.]
1	Membran-extrahierter Wildtyp	0.99	0.02	-
2	Rückgefalteter Wildtyp	0.87	0.02	-11% [1]

Referenz-Mutanten und nativer NCL-Hybrid

3	OmpF-N27C	0.91	0.02	+5% [2]
4	OmpF-K16C	0.92	0.02	+6% [2]
5	Natives NCL-Produkt (Produkt 22, enthält N27C-Mutation)	0.89	0.02	+2% [2]

Hybrid 28, erzeugt durch NCL gekoppelt mit [3+2]-Click-Reaktion

6	OmpF-III16-13 Route a) (Produkt 28)	0.93	0.04	+4% [5]
7	OmpF-III16-13 Route b) (Produkt 28)	0.90	0.05	+1% [5]

Hybride, erzeugt durch S-Alkylierung an Cys16

8	OmpF-Cys16-17 (Produkt 26)	Minimalwert: 0.42	0.01	-44% [4]
		Gemittelt: 0.75	0.01	-19% [4]
		Maximalwert: 1.14	0.02	+24% [4]
9	OmpF-Cys16-19 (Produkt 25)	Minimalwert: 0.56	0.02	-39% [4]
		Gemittelt: 0.78	0.02	-16% [4]
		Maximalwert: 1.08	0.02	+17% [4]

Hybride, erzeugt durch S-Alkylierung und [3+2]-Click-Reaktion

10	Cys16-18-13 (Produkt 30d)	Minimalwert: 0.50	0.02	-46% [4]
		Gemittelt: 0.81	0.01	-12% [4]
		Maximalwert: 1.14	0.02	+24% [4]
11	Cys221-18-13 (Produkt 30b)	Minimalwert: 0.53	0.01	-42% [4]
		Gemittelt: 0.78	0.01	-15% [4]
		Maximalwert: 1.05	0.01	+14% [4]
12	Cys181-18-13 (Produkt 30a)	0.84	0.01	-9% [4]
13	Cys226-18-13 (Produkt 30c)	0.76	0.01	-17% [4]

Tabelle 4.4: Übersicht der mittels BLM bestimmten Leitfähigkeiten.

4.10. Strukturelle Charakterisierung hybrider OmpF-Poren

4.10.1. Kristallisation von Wildtyp OmpF durch *sitting drop*-Kristallisation

In der Literatur sind verschiedene Ansätze zur Kristallisation von OmpF mit daraus resultierenden unterschiedlichen Kristallformen bekannt, die aber zumeist auf der Methode der Mikrodialyse beruhen.^[119, 152, 153] Durch das Aufkommen sowohl von kommerziellen Kristallisationsscreens als auch der Pipettierrobotik wurde zu Beginn dieser Arbeit natives OmpF einem breit gefächerten Kristallisationsscreen unterzogen. Hierzu wurde das aus der Membran aufgereinigte native OmpF gegen zwei unterschiedliche Kristallisationspuffer dialysiert, die sich hinsichtlich des Detergenzes unterschieden (**Tab. 4.5**). Beide Bedingungen wurden aus bekannten Kristallisationsbedingungen abgeleitet.^[119, 152] OmpF in einer Konzentration von 8.0 mg/mL wurde bei einer Temperatur von 18 °C mit einer Tropfengröße von 300 + 300 nL in insgesamt acht Screens im 96-*well*-Format auspipettiert. Bereits nach wenigen Tagen traten vereinzelt erste Kristalle auf. Nach etwa drei Wochen fanden sich in rund 14 Bedingungen Kristalle, die hauptsächlich als dünne hexagonale Plättchen oder als tetragonale Kristallform auftraten (**Abb. 4.39**). Die Kristalle wurden in Glycerin-haltigem Cryopuffer getränkt und anschließend in flüssigem Stickstoff weggefroren. Bei der röntgenographischen Charakterisierung am DESY zeigte sich jedoch, dass die Kristalle keine Diffraktion aufwiesen. Auch stellte sich eine schlechte Reproduzierbarkeit dieser Kristalle sowohl im 24- als auch im 96-*well*-Maßstab heraus.

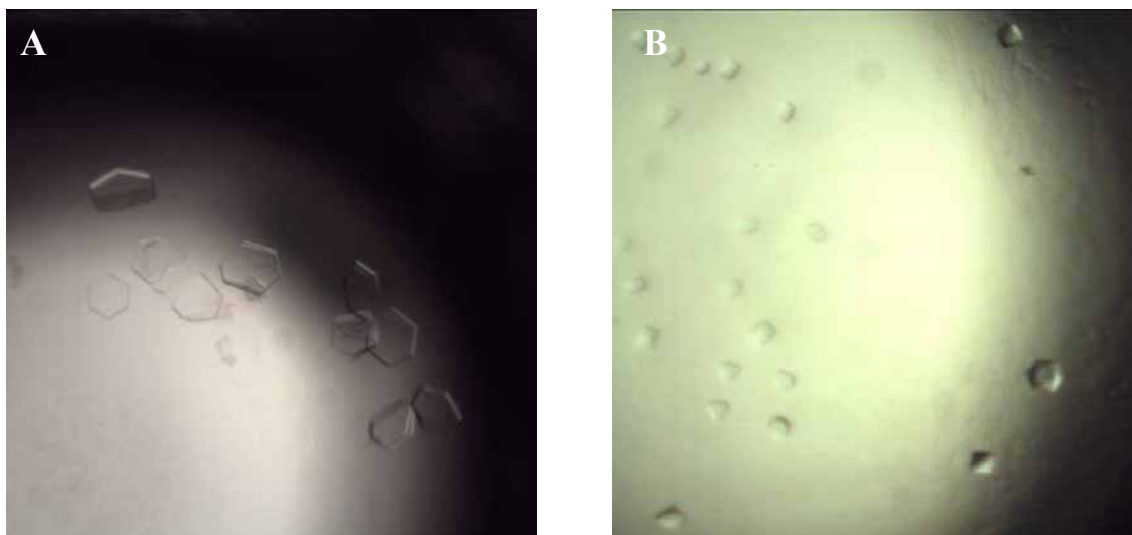


Abbildung 4.39: Kristalle von nativem OmpF, erzeugt durch *sitting drop*-Kristallisation. (A) hexagonale Plättchen (in 5% Dioxan, 0.8 M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, 0.1 M MES; pH 6.5); (B) tetragonale Kristalle (in 10% PEG 8000, 0.5 M LiSO_4). OmpF wurde in beiden Fällen gegen Dialysepuffer I dialysiert.

Dialysepuffer I	Dialysepuffer II
10 mM Tris/HCl; pH 8.0	10 mM Tris/HCl; pH 8.0
0.5% octyl-POE	0.1% octyl-POE
	0.6% C ₈ (HE)SO

Tabelle 4.5: Verwendete Dialysepuffer für die Kristallisation von Wildtyp OmpF.

4.10.2. Kristallisation von Wildtyp OmpF durch Mikrodialyse

Die strukturelle Charakterisierung von OmpF durch Kristallisation via Mikrodialyse wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen als Standardmethode verwendet, bei der die Kristalle unter Raumtemperaturbedingungen vermessen wurden.^[119, 152, 153] Die Kristallisation von nativem OmpF sollte zum einen zur Etablierung der Kristallisationsmethode und zum anderen zur Erzeugung von *Seed*-Kristallen für spätere Kristallisationsversuche von hybriden OmpF-Poren verwendet werden.

Hierzu wurde das aufgereinigte Protein gegen den entsprechenden Puffer dialysiert (**Tab. 4.6**). und in einer Konzentration von 8.4 – 10 mg/mL für die Kristallisationsexperimente eingesetzt. Die Inkubationstemperatur betrug 18 °C. Die Mikrodialyse erfolgte gegen die gleiche Pufferzusammensetzung mit Ausnahme von PEG 2000, das als Präzipitant in der Konzentration variiert wurde. Bereits nach zwei bis drei Tagen konnten tetragonal geformte Kristalle (**Abb. 4.40**) beobachtet werden, die sich an der Membrangrenzfläche bildeten. Hierbei zeigte sich, dass bereits ein PEG 2000 - Konzentrationsunterschied von 0.5% einen dramatischen Effekt auf die Kristallisation hatte. Die besten Ergebnisse lieferte eine mittlere PEG 2000 - Konzentration (13/13.5%).

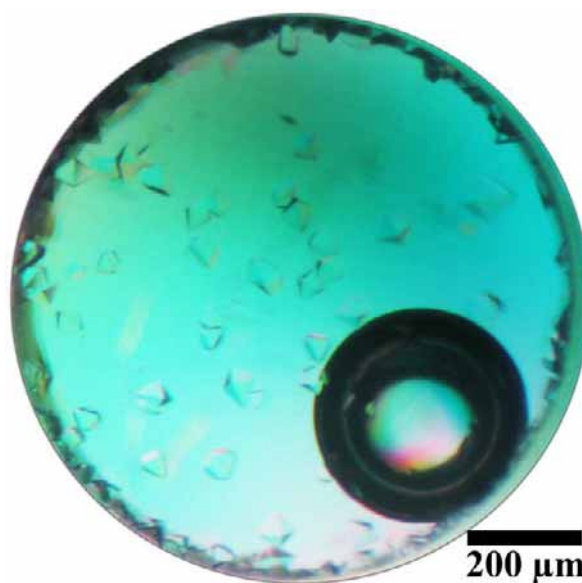


Abbildung 4.40: Aufsicht durch einen Polarisationsfilter auf einen Kristallisationsansatz bei 13% PEG 2000 in der Mikrodialyse-Kammer.

Als größte Schwachstelle dieser Methode stellte sich das Fischen der Kristalle unter dem Mikroskop heraus. Nach Ablösen der Membran von der Mikrodialyseeinheit zeigte sich, dass eine Mehrzahl der Kristalle an der Membran haftete und daher möglichst vorsichtig und

schnell abgelöst werden mussten, um eine mechanische Schädigung der Kristalle sowie Austrocknung zu verhindern.

Als Cryoprotectant wurde 25% Glycerin zu der Kristallisationsbedingung zugesetzt, wobei auch der Zusatz von Detergenzien getestet wurde. Da die Kristalle in diesem Puffer nicht stabil waren, wurden sie nur kurz (2 – 5 s) getränkt. Bei der anschließenden röntgenkristallographischen Charakterisierung am ESRF stellte sich heraus, dass die mangelnde Stabilität in Cryopuffer eine Auflösung von bestenfalls 4 Å zur Folge hatte. Weitere Versuche, die Streukraft der Kristalle in einem anderen Cryoprotectant (30% Trehalose, 25% MPD, 25% PEG 400, 4 M Na/K-Phosphat) zu verbessern, stellten sich ebenfalls als ungeeignet heraus, wobei als Ursache auch eine Schädigung der Kristalle beim Fischen in Betracht gezogen werden muss.

Dialysepuffer	Puffer im Reservoir
7.5% PEG 2000	12% - 14.5% PEG 2000 (in 0.5% Schritten variiert)
0.5 M NaCl	0.5 M NaCl
0.1 M Na-Phosphat; pH 6.5	0.1 M Na-Phosphat; pH 6.5
0.9% OG	0.9% OG
0.09% octyl-POE	0.09% octyl-POE

Tabelle 4.6: Dialysepuffer- und Reservoirzusammensetzung für die Mikrodialyse von OmpF

4.10.3. Kristallisation von OmpF-K16C mit kovalent verknüpfter Dibenzo-18-Krone-6 (17)

Das durch Rückfaltung gewonnene hybride OmpF-K16C-17 wurde nach der Ionenaustausch-Chromatographie bis zu einer Konzentration von 8.4 mg/mL aufkonzentriert. Nach Dialyse wurde das Protein einem Kristallisations-Screen am Cartesian-Pipettierroboter unterzogen. Hierbei wurden sechs verschiedene kommerzielle Screens verwendet, die Tropfengröße betrug 300 + 300 nL. Die Platten wurden bei konstanten 18 °C inkubiert. Bereits nach einem Tag konnten in einer Bedingung (Nextal Classics, Nr. 7) Kristalle beobachtet werden. Weitere Kristalle wuchsen in insgesamt sieben Bedingungen, die in zwei unterschiedlichen Morphologien auftraten: entweder als hexagonale Plättchen oder als Säulen. Rund 30 Kristalle konnten am ESRF vermessen werden, von denen zwei Kristalle schließlich röntgenographisch bis zu einer Auflösung von 3.2 Å beziehungsweise 3.4 Å vermessen

wurden. Diese benötigten eine Wachstumsdauer von etwa zwei bis drei Wochen und hatten eine Größe von $75 \times 75 \times 15 \mu\text{m}^3$ (SR619, Hexagon) und $140 \times 25 \times 25 \mu\text{m}^3$ (SR621, Säule). Die genauen Kristallisationsbedingungen sind in **Tab. 4.7** zusammengefasst.

SR619 JCSG Nr. 22	SR621 MBC I Nr. 38
0.2 M MgCl_2	0.2 M CaCl_2
0.1 M Na-Cacodylat; pH 6.5	0.1 M Na-HEPES; pH 7.5
50% PEG 200	48% PEG 400

Tabelle 4.7: Kristallisationsbedingung der beiden vermessenen Kristalle

Der Kristall SR619 wurde vor dem Einfrieren in flüssigen Stickstoff kurz in die Mutterlauge eingetaucht, die zusätzlich mit 25% Glycerin als Cryoprotectant versetzt war. Dieser Kristall zeigte makroskopische Stabilität und wurde direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. **Abb. 4.41** zeigt die beiden erhaltenen Kristallformen.

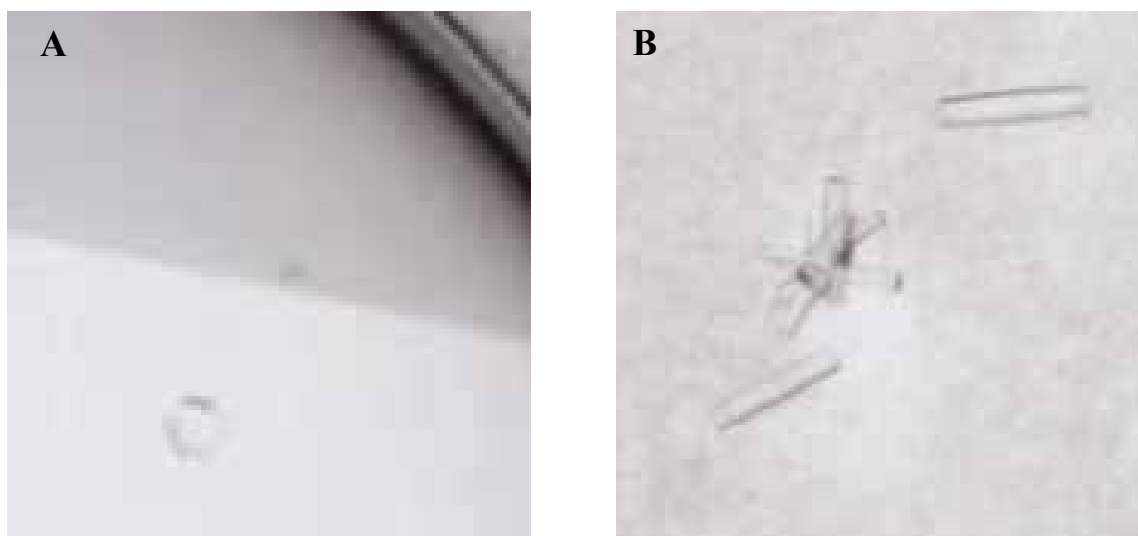


Abb. 4.41: Kristalle von OmpF-K16C-17. (A) Kristall in Bedingung Nr. 22, JCSG-Suite (B) Kristalle in Bedingung Nr. 38, MBC I-Suite.

4.10.4. Datensammlung und Strukturverfeinerung von OmpF-Cys16-17

Die beiden relativ kleinen Kristalle SR619 und SR621 wurden mittels hochenergetischer Synchrotronstrahlung, fokussiert auf $150 \times 150 \mu\text{m}^2$, bei einer Temperatur von 100 K am ESRF vermessen. **Abb. 4.42 A** zeigt die beiden Kristalle montiert im *Micromount* und **Abb. 4.42 B** je ein beispielhaftes Diffraktionsbild

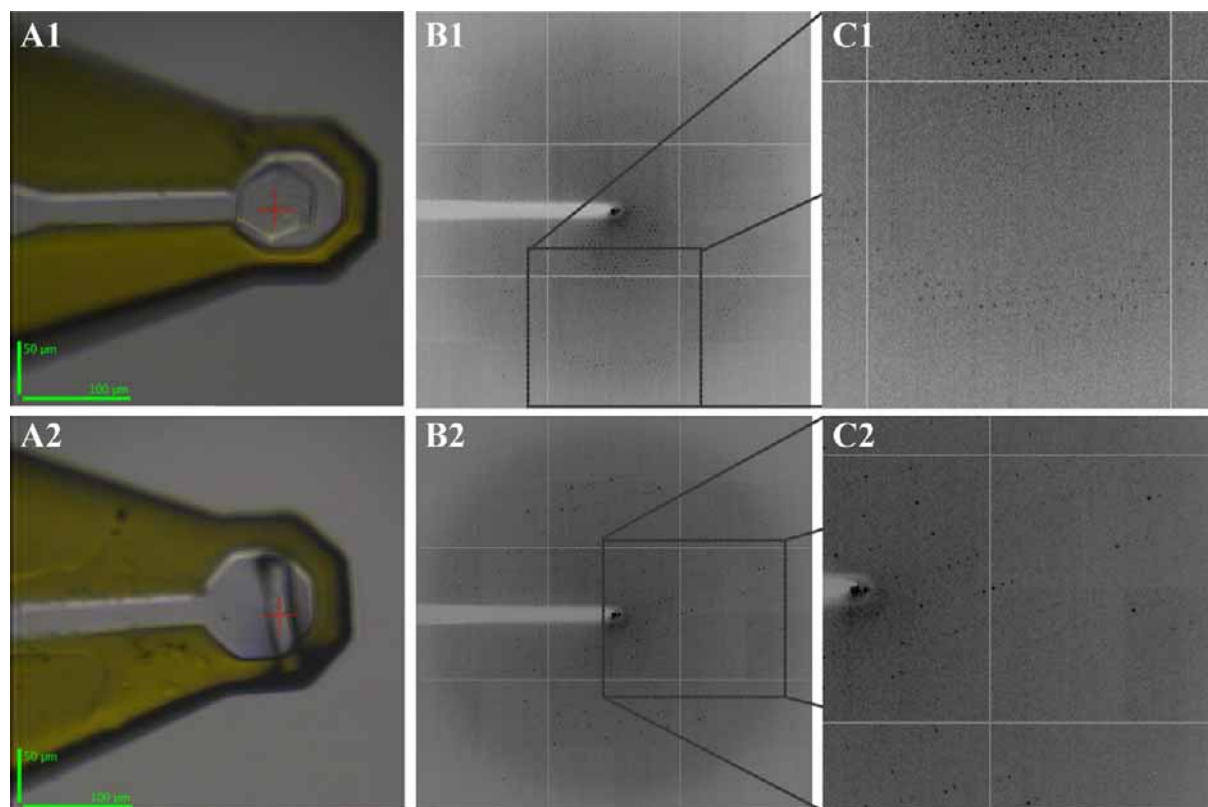


Abbildung 4.42: (A1/2) Kristall montiert im *Micromount*. (B1/2) Beispielhaftes Diffraktionsbild. (C1/2) Zoom in das Diffraktionsbild. Die Ecke des Bildes entspricht einer Auflösung von 3 Å, der Rand des Bildes 2.18 Å. 1-SR619; 2-SR621.

Die erhaltenen Diffraktionsbilder der Einkristalle wurden mit Hilfe des Programms XDS^[141] indiziert und prozessiert, die Datenreduktion wurde mit XSCALE^[141] durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass beide Kristalle in der trigonalen Raumgruppe *P321* kristallisierten. Die Zellparameter von SR619 entsprachen einer bereits bekannten Kristallform, während die Parameter von SR621 einer neuen Kristallform entsprachen. Der Solvensgehalt betrug für SR619 54.3% mit einem Molekül pro asymmetrischer Einheit und einem Matthews-Koeffizient von 2.7. Bei SR621 wurde ein deutlich höherer Solvensgehalt mit 63.9% festgestellt (ebenfalls ein Molekül pro asymmetrischer Einheit); der Matthews-Koeffizient lag hier bei 3.4. Als Modell für die Strukturlösung diente OmpF, Kette A (PDB-Code: 2OMF), welches direkt im Programm REFMAC^[144] zur Verfeinerung der Struktur verwendet wurde. Grundlegend hierbei ist die Annahme, dass die Kristallpackung identisch ist. Für den Datensatz SR619 wurde auf diese Art eine Lösung der Struktur erhalten. Es zeigte sich jedoch, dass keine Differenzelektronendichte an der Position des Kronenether-Moleküls zu beobachten war. Zur Strukturlösung des Datensatzes SR621 wurde *molecular replacement* mithilfe der PHASER-Suite^[142] und Röntgendaten bis zu einer Auflösung von 3.4 Å durchgeführt. Als Suchmodell diente o. g. Struktur. Die erhaltene Lösung zeichnete sich

durch hohe Z-Werte von 10.8 und 34.2 für die Rotations- bzw. für die Translationsfunktion aus. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei SR621 um eine neuartige Kristallform (siehe **Abb. 4.43**). Die OmpF-Trimere bilden eine röhrenartige Struktur aus, die zum einen den hohen Solvensgehalt und zum anderen die Kristallmorphologie erklärt.

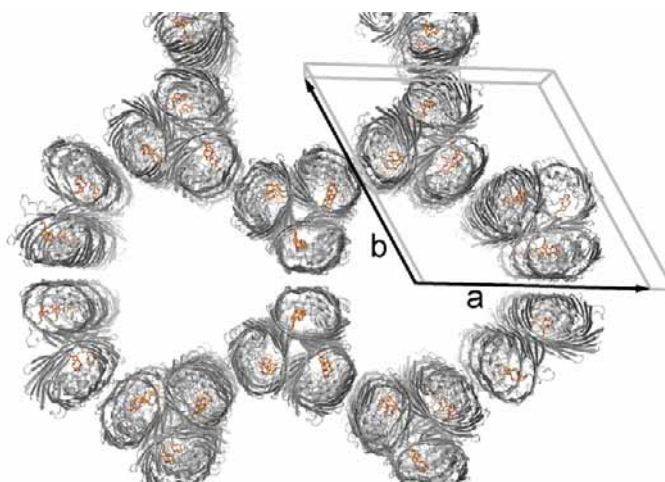


Abbildung 4.43: Ausschnitt aus der Kristallpackung von OmpF-Cys16-17 mit Blickrichtung entlang der c-Achse (die Einheitszelle ist in grau eingezeichnet). Kristall: SR621, $a = 135.52 \text{ \AA}$, $b = 135.52 \text{ \AA}$, $c = 47.52 \text{ \AA}$.

Zusätzlich konnte in dieser Kristallform Differenzelektronendichte in der SIGMAA-gewichteten $F_{obs}-F_{calc}$ OMIT-Map beobachtet werden. Nach der Editierung des stereochemischen Bibliothekseintrages für das Dibenzo-18-Krone-6-Derivat, das bereits strukturell untersucht wurde,^[154, 155] konnte dieser Baustein in die Differenzelektronendichte eingefügt und verfeinert werden (stereochemische Parameter siehe Kapitel 7.2). Dabei wurden verschiedene Konformationen (*cis/trans*-Orientierung der Bindung Cys16-S_γ/C30 sowie zwei Orientierungen für N27/C2) berücksichtigt, jedoch wurde nur für eins der vier möglichen Konformere eine passende Übereinstimmung mit der Elektronendichte gefunden. **Abb. 4.44 A** zeigt die berechnete SIGMAA-gewichtete $F_{obs}-F_{calc}$ OMIT-Map für die Dibenzo-18-Krone-6. Weiterhin wurde bei der Verfeinerung der Struktur positive Differenzelektronendichte gefunden, in die ein dem Kristallisationspuffer entstammendes HEPES-Molekül eingefügt werden konnte (**Abb. 4.44 B**). Die am Ende der Verfeinerung mittels COOT^[143] und REFMAC^[144] erhaltenen R-Faktoren betrugen 24.9% für den Arbeits-R-Faktor und 29.6% für den freien R-Faktor.

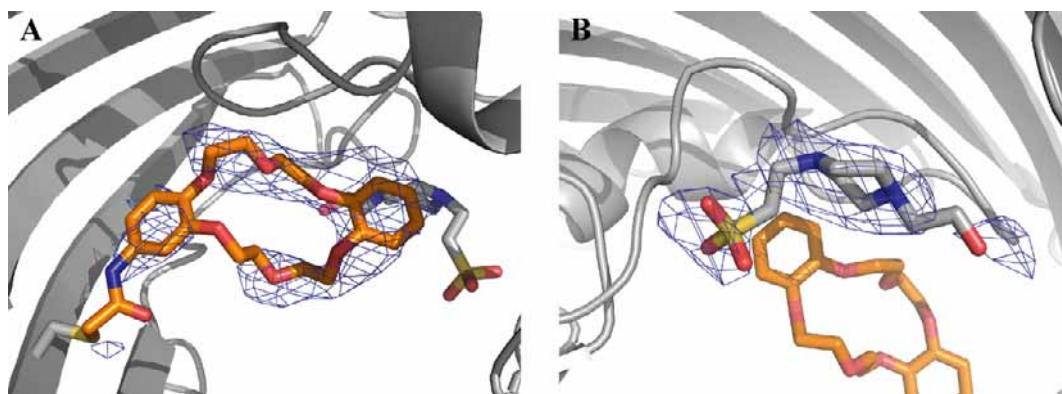


Abbildung 4.44: SIGMAA-gewichtete $F_{obs}-F_{calc}$ OMIT-Map, berechnet bei einer Auflösung von 3.4 Å, für (A) die Dibenzo-18-Krone-6 bei einem Konturierungslevel von 2.7 σ und (B) das HEPES-Molekül bei einem Konturierungslevel von 2.5 σ .

Die nachfolgende **Tab. 4.8** enthält die Statistik der Datensammlung beider Kristalle sowie die Verfeinerung von SR621.

A. Datensammlung		
Bezeichnung des Datensatzes	SR619	SR621
Röntgenquelle	ID29, ESRF	ID29, ESRF
Wellenlänge d. Röntgenstrahlung (Å)	0.9184	0.9184
Detektor	ADSC	ADSC
Temperatur (K)	100	100
Auflösung (Å)	45.3-3.2	44.4 – 3.4
Raumgruppe	<i>P</i> 321	<i>P</i> 321
Zelldimensionen (<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i>) (Å)	116.60, 116.60, 50.65	135.52, 135.52, 47.52
Winkel (α , β , γ) (°)	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
Beobachtete Reflexe F	31764	38069
Multiplizität ^a	5.3 (4.9)	5.4 (4.0)
Einzigartige Reflexe F	5977	6991
Vollständigkeit (%) ^a	0.892 (0.640)	98.8 (97.2)
I/σ (I) ^a , R_{merge} ^{a,b}	8.9 (3.5), 0.171 (0.397)	9.5 (5.0), 17.0 (27.4)
Mosaizität (°)	0.368	0.31
Wilson B-Faktor (Å ²)	63.9	25.4

B. Verfeinerungsstatistik

Reflexe ($F > 0$), R -free Satz (%)	-	6598, 5.6
$R_{\text{work}}^c / R_{\text{free}}^d$ (%)	-	24.9, 29.6
Gesamte Anzahl d. Atome	-	2623
Mittlerer B -Wert (\AA^2)	-	54.3
r.m.s.d. Bindungen (\AA), Winkel ($^\circ$)	-	0.010, 1.294

Tabelle 4.8: Statistik der Datensammlung und der Verfeinerung von OmpF-Cys-17-Kristallen.^a Die Werte in den Klammern stehen für die höchste Auflösungsschale^b $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i (I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle) / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})$ ^c $R_{\text{work}} = \sum (F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}) / \sum (F_{\text{obs}})$ ^d R_{free} = Kristallographischer R-Faktor basierend auf 5.6% der Daten, die nicht für die Verfeinerung verwendet wurden**4.10.5. Die Kristallstruktur von OmpF-Cys16-17**

Abb. 4.45 A zeigt die Aufsicht auf das Trimer der OmpF-K16C-Mutante, bei der durch S-Alkylierung am β -Strang 1 die Dibenzo-18-Krone-6 (**17**) kovalent verknüpft wurde. Dieser Anknüpfungspunkt wurde so gewählt, dass er in der Mitte der OmpF-Pore gegenüber der Engstelle, die durch die Schleife L3 gebildet wird, liegt. An dieser Stelle wurde eine maximale Wechselwirkung mit der L3-Schleife und die drastischste Verengung der Pore erwartet. So sollte ein größtmöglicher Effekt auf die Leitfähigkeit des Kanals erwirkt werden. Wie **Abb. 4.45 B** zeigt, liegt der Kronenether in der Mitte der Pore in einer *inward*-Orientierung.

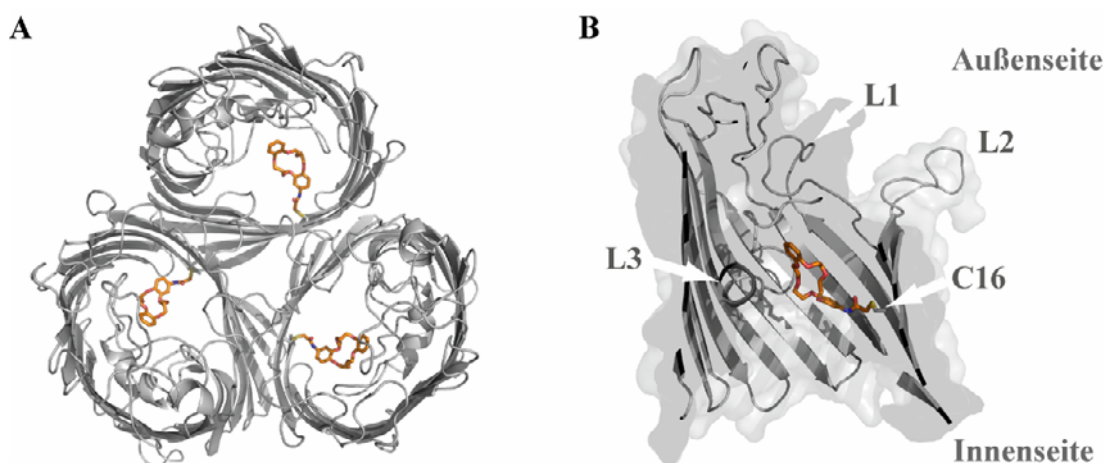


Abbildung 4.45: (A) Aufsicht auf das trimere OmpF mit verknüpfter Dibenzo-18-Krone-6 **17**. (B) Die Seitenansicht auf ein OmpF-Monomer zeigt die Lage und Verzerrung des Kronenethers, durchscheinend ist die Oberfläche der Pore dargestellt; die vorderen β -Stränge wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen.

Der Polyoxyethylen-Ring ist in einer deformierten Konformation durch die Pore gespannt, sodass ein Teil der Sauerstoff-Atome in der Nähe der basischen Seitenketten der Reste Arg42, Arg82 und Arg132 zu liegen kommt (**Abb. 4.46**; 2.9 – 5.0 Å). Der andere Teil der Sauerstoff-Atome liegt in der Nähe der sauren Reste von Aminosäure Asp113 und Glu117, von denen Asp113 eine geeignete Entfernung für elektrostatische Wechselwirkungen aufweist (2.9 Å).

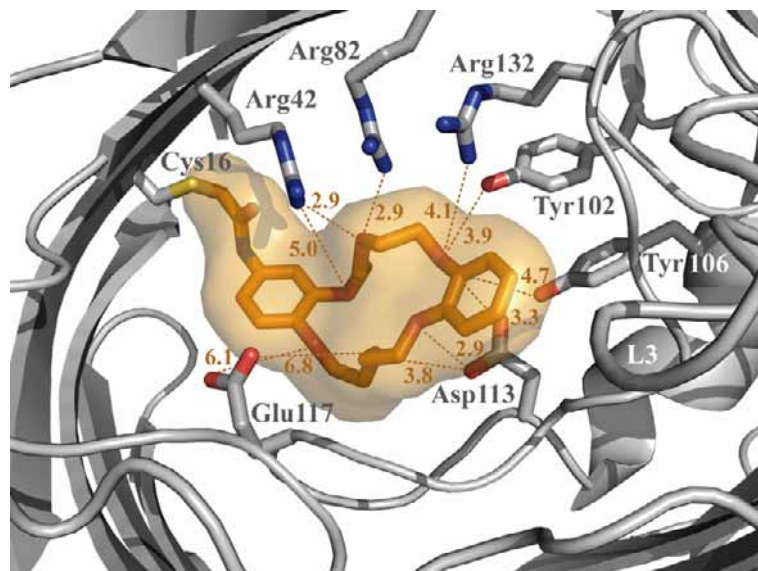


Abbildung 4.46: Dargestellt sind die den Kronenether umgebenden sauren und basischen Aminosäuren sowie zwei aromatischen AA; die Bindungsabstände zwischen den N/O-Atompositionen der Seitenketten und der Sauerstoff-Atome des Polyoxyethylenrings sind in Å angegeben.

Bei einer möglichen Komplexierung eines monovalenten Kations wie z. B. Kalium, für die die Dibenzo-18-Krone-6 eine erhöhte Komplexierungskonstante aufweist,^[156, 157] käme Asp113 als zusätzlicher Ligand für K^+ mit einem Abstand von 4.1 Å in Frage; Glu117 mit einem deutlich größeren Abstand von 6.9 Å ist zu weit entfernt. Der hydrophobe „hintere“ Aromat des Kronenethers bildet verschiedene *van der Waals*-Wechselwirkungen mit der Schleife L3, unter anderem mit den Seitenketten von Tyr102 und 106, Asp113, Ala123 und Arg132. Zusätzlich befindet sich das in der Elektronendichte gut definierte HEPES-Molekül über dem Aromaten in einer Entfernung von 5 Å.

4.10.6. PDB-Eintrag der Kristallstruktur von OmpF-Cys16-17

Die Kristallstruktur der hybriden OmpF-Pore wurde in der *Protein Data Bank* hinterlegt und ist unter dem Code 3FYX verfügbar.

5 Diskussion

5.1. SPPS/NCL/[3+2]-Click-Chemie und S-Alkylierung als Methoden zur Erzeugung hybrider OmpF-Poren

In dieser Arbeit wurden zur Erzeugung synthetisch modifizierter Ionenkanäle auf Basis des trimeren OmpF zwei divergente Strategien angewendet, die jeweils über ihre spezifischen Vor- und Nachteile verfügen. Durch die gezielte Mutagenese können Cysteine (oder auch andere Aminosäuren) in die Pore eingeführt werden, eine Voraussetzung für eine gezielte Umsetzung mit S-Alkylierungsreagenzien ist jedoch die Abwesenheit weiterer Cysteine. An dieser Aminosäure kann ortsspezifisch ein Modulator angeknüpft werden. Ein Vorteil ist, dass dabei jede beliebige Aminosäure im Protein ausgetauscht werden kann, insofern sich dadurch keine Probleme bei der Rückfaltung oder der Funktionstüchtigkeit des Proteins ergeben. Ein Nachteil dieser Strategie ist, dass die Auswahlmöglichkeit an funktionellen Gruppen auf die Aminosäureseitenketten beschränkt ist. Im Gegensatz hierzu können bei der zweiten Strategie nicht-natürliche Aminosäuren in das Protein eingeführt werden, wodurch eine Vielfalt an funktionellen Gruppen verfügbar ist. Durch die Kombination aus Festphasensynthese und rekombinanter Expression wird der N- bzw. C-Terminus synthetisch erzeugt, wobei hier eine Limitierung seitens der Länge des synthetischen Peptids von ~50 Aminosäuren besteht.^[158] Die Fragmente können getrennt voneinander und vor der Verknüpfungsreaktion modifiziert werden, was die Anwesenheit sonst störender Funktionalitäten erlaubt. Ebenso können asymmetrische Modulatoren über eine 2-Punkt-Anknüpfung in der Pore befestigt werden, da sich in beiden Fragmenten unterschiedliche funktionelle Gruppen befinden können. Als Nachteil dieser Strategie ist der hohe synthetische Aufwand zu benennen. Auch ist der gesamte Reaktionsumsatz niedriger als bei der S-Alkylierung, da mit der NCL ein weiterer Reaktionsschritt benötigt wird, der hier mit einem gefundenen Umsatz von 50 – 60% abläuft.

Eine Voraussetzung für beide Strategien ist die effiziente Rückfaltung der OmpF-Hybride, sofern die Modifikation im denaturierten Zustand durchgeführt wird. Diese konnte ohne signifikante Einbußen verglichen mit dem Wildtyp durchgeführt werden, der ebenfalls mit einer Ausbeute von rund 70% zurückgefaltet wurde.^[121] Im Anschluss an die Rückfaltung konnte die trimere Spezies für die anschließende Charakterisierung in hoher Reinheit isoliert werden. Bei der elektrophysiologischen Charakterisierung zeigte sich, dass die jeweiligen Referenzmutanten bzw. Referenzhybride für beide Strategien nur geringfügige Abweichungen

gegenüber Wildtyp OmpF zeigten, sodass eine valide Ausgangsbasis für hybride OmpF-Poren via SPPS/NCL/[3+2]-Click-Chemie oder S-Alkylierung erreicht wurde.

5.2. *Die Kristallisation von nativem und modifiziertem OmpF*

OmpF wurde bisher überwiegend durch Mikrodialyse kristallisiert, und die erhaltenen Kristalle wurden bei Raumtemperatur röntgenkristallographisch vermessen. Da die Probenmenge der hybriden OmpF-Poren limitiert, sowie die Größe und Qualität der erhaltenen Kristalle nicht vorherzusagen war, sollte zunächst a) die Kristallisation mittels moderner Pipettierrobotik und b) die Kristalle stabilisierende Cryo-Bedingungen etabliert werden.

Im anfänglich durchgeführten Kristallisationsscreen zeigte sich prinzipiell die gute Kristallisierbarkeit von OmpF, die Kristalle konnten jedoch nicht reproduziert werden und zeigten Intoleranz gegenüber dem Cryoprotectant Glycerin. Daher wurde die Methode der Mikrodialyse angewendet, die ihre eigenen Schwierigkeiten birgt. Die erhaltenen Kristalle konnten einerseits reproduzierbar erzeugt werden, zeigten aber andererseits nur schwache Diffraktion. Als Ursache hierfür kann die mechanische Belastung oder die kurze Verweildauer an der Luft beim Überführen der Kristalle in Frage kommen. Auch zeigten die erhaltenen Kristalle wiederum eine schlechte Verträglichkeit gegenüber Glycerin, die sich auch durch die Verwendung alternativer Cryosubstanzen nicht verbesserte.

Für die Kristallisation des OmpF-Hybrids **26** wurde erneut ein kompletter Kristallisationsscreen durchgeführt. Als Voraussetzung hierfür muss ausreichend Protein in geeigneter Konzentration und Reinheit vorliegen. Es wurden in einigen Bedingungen Kristalle beobachtet, die recht klein waren. Diese konnten entweder direkt in fl. Stickstoff weggefroren werden oder waren stabil in der glycerinhaltigen Mutterlauge. Durch den Einsatz der Mikrofokus-Beamline am ESRF (fokussierbar auf $10 \times 10 \mu\text{m}^2$) können jedoch auch sehr kleine Kristalle vermessen werden, sodass die Größe in erster Näherung vernachlässigbar wird.

Da es sich bei den hybriden OmpF-Poren um Proteine mit veränderten Eigenschaften handelt, ist die Durchführung eines Kristallisationsscreens für jedes neue Hybrid empfehlenswert. Die Analyse des Kronenether-modifizierten OmpF-Kristalls bestätigt dies, da die gefundene Kristallpackung von SR621 eine neuartige war. **Abb. 5.1 A, B** illustriert den Vergleich dieser Packung mit der des Wildtyps. Beide Packungen bilden eine ähnliche röhrenförmige Anordnung aus, die aber im Falle des hybriden OmpF deutlich größere wassergefüllte Kanäle aufweist. So verfügt die Einheitszelle des hybriden OmpF über einen Wassergehalt von rund

64% und besitzt ein Volumen von $756\,130\text{ \AA}^3$. Der Wildtyp hingegen weist einen Wassergehalt von $\sim 58\%$ und ein Volumen von $640\,882\text{ \AA}^3$ auf. Beide Proteine unterscheiden sich jedoch nur in dem angeknüpften Modulator, der sich im Inneren der Pore befindet und das Kristallisationsverhalten von OmpF nicht beeinflussen sollte. Als Ursache für dieses scheinbar widersprüchliche Verhalten sind mehrere Gründe verantwortlich: zum einen wurde das Protein in unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen kristallisiert, was einen anderen Packungszustand favorisieren kann. So wurde z. B. das der Kristallisationsbedingung entstammende HEPES-Molekül in der Elektronendichte gefunden, das einen Einfluss auf die Packung ausüben könnte. Zum anderen wurde für die Kristallisation des hybriden OmpF eine andere Präparationsmethode verwendet. Dieses Protein wurde durch Rückfaltung aus *inclusion bodies* generiert, während der Wildtyp von OmpF bisher ausschließlich durch Extraktion aus der äußeren Membran gewonnen wurde. Hierdurch können sich Unterschiede in der Lipidkomposition ergeben, da bei der Membranextraktion endogene *E. coli*-Lipide anhaften können, die wiederum die Kristallisation beeinflussen können. Dieses wird in der Röntgenstruktur von OmpF ersichtlich, die im Jahr 2008 publiziert wurde und über eine Auflösung von 1.6 \AA verfügt.^[159] Hier sind die zugesetzten Lipide/Detergenzien mit den OmpF-Molekülen assoziiert und besetzen die Trimer-Grenzflächen (**Abb. 5.1 C**).

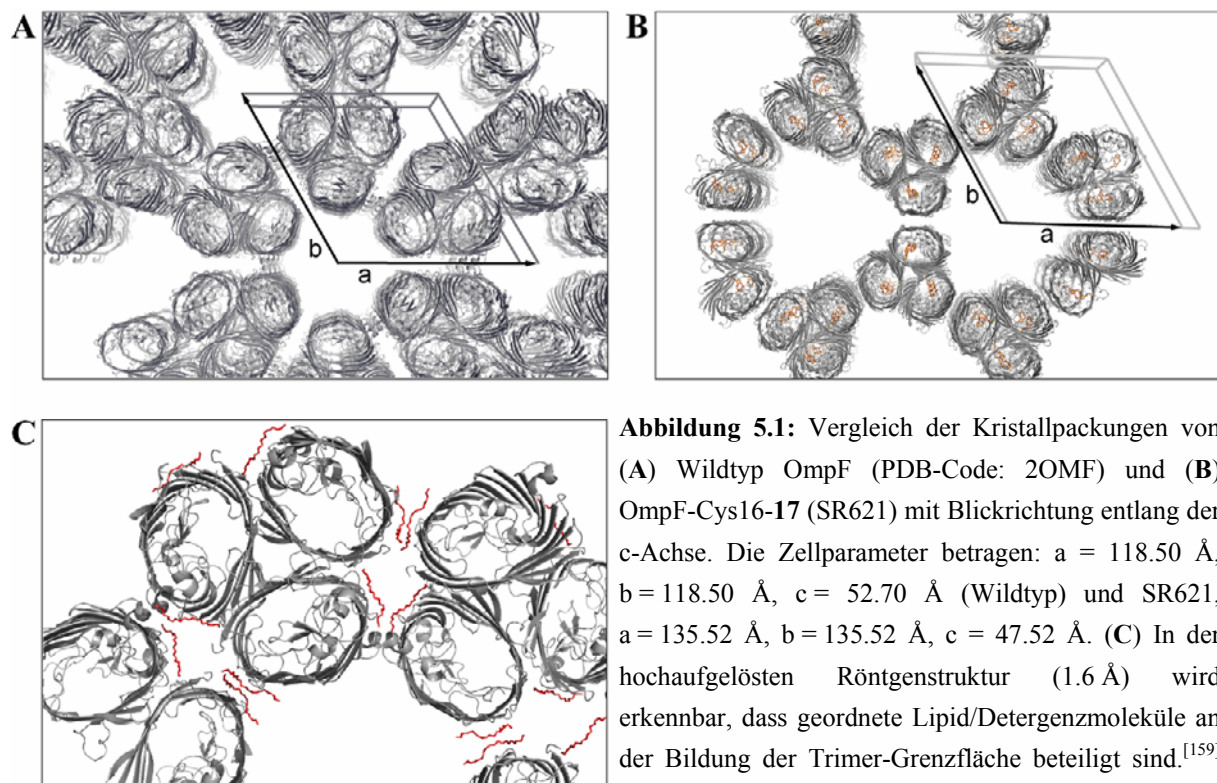


Abbildung 5.1: Vergleich der Kristallpackungen von (A) Wildtyp OmpF (PDB-Code: 2OMF) und (B) OmpF-Cys16-17 (SR621) mit Blickrichtung entlang der c-Achse. Die Zellparameter betragen: $a = 118.50\text{ \AA}$, $b = 118.50\text{ \AA}$, $c = 52.70\text{ \AA}$ (Wildtyp) und SR621, $a = 135.52\text{ \AA}$, $b = 135.52\text{ \AA}$, $c = 47.52\text{ \AA}$. (C) In der hochauflösten Röntgenstruktur (1.6 \AA) wird erkennbar, dass geordnete Lipid/Detergenzmoleküle an der Bildung der Trimer-Grenzfläche beteiligt sind.^[159] Das Detergenz ist (Hydroxyethyloxy)tri-(ethyloxy)octane; PDB-Code: 2ZFG.

5.3. Zur Struktur und Funktion hybrider OmpF-Poren

5.3.1. Elektrophysiologische Eigenschaften von OmpF

Um auf eine veränderte Umgebung reagieren zu können, müssen die Zellen in der Lage sein, die Permeabilität der äußeren Membran anzupassen. Die Zellen erreichen dies, indem sie die Genexpression der *Omp* kontrollieren, deren Zusammensetzung in der Membran verändern und modifizierte Porintypen in die Membran einbauen. Darüber hinaus zeigen die Porine eine Reaktion auf unterschiedlichste Einflüsse wie das anliegende Membranpotential, den pH-Wert, mechanische Spannungen der Membran, Moleküle wie z. B. Polyamine, die Ionenstärke etc., die sich meist durch eine verminderte oder erhöhte Offenwahrscheinlichkeit äußert. Jedoch verbleibt die genaue physiologische Bedeutung der beobachteten Abhängigkeiten größtenteils unklar.^[160]

Für den Ionenkanal OmpF, der bei physiologischen Salzkonzentrationen eine leichte Selektivität für Kationen aufweist,^[149] wurde ein spannungsabhängiges Schließen bei einer kritischen Spannung (V_c) von 130 mV beobachtet.^[161] Dieser Wert ergibt sich nach Anlegen einer Rampe an eine künstliche Membran, in der sich OmpF-Kanäle befinden und bei der langsam die Spannung linear erhöht wird (**Abb. 5.2**). Ein Teil der Kanäle beginnt sich bei V_c zu schließen, und eine Erniedrigung der Spannung führt zu einem erneuten Öffnen der Pore, sodass eine Hystereseschleife durchlaufen wird.^[160]

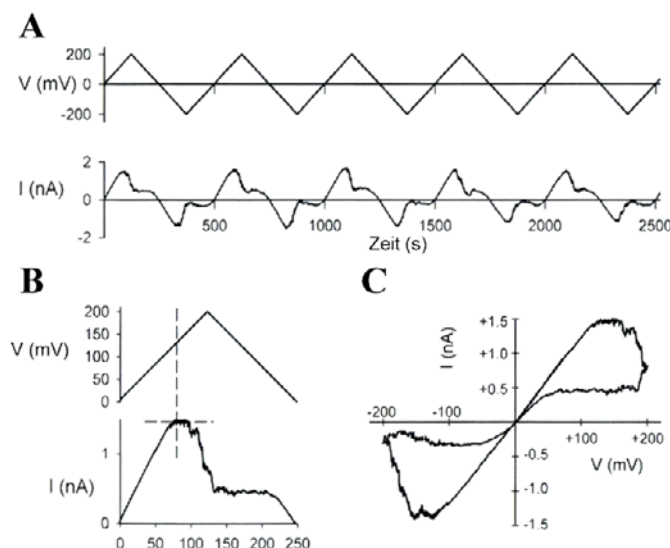


Abbildung 5.2: Spannungsabhängigkeit von OmpF (A) Nach dem Einbau vieler Kanäle in die Membran und wurde eine Dreieck-Rampe mit $1.6 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ angelegt, der resultierende Stromfluss wurde aufgezeichnet. (B) Details der ersten 250 s von (A). V_c ist definiert als die Spannung, bei der Kanäle anfangen zu schließen. (C) Der Stromfluss der ersten 500 s von (A) gegen die Spannung aufgetragen ergibt eine Hystereseschleife.^[164]

Um dieses Verhalten aufzuklären wurden verschiedene Studien, insbesondere an der in der Pore liegenden Schleife L3, durchgeführt. So wurde diese Region mittels Disulfidbrücken an der Porenwand fixiert, um einen durch Bewegung verursachten Schließmechanismus zu untersuchen,^[162, 163] oder Teile der Schleife wurde deletiert.^[161, 162] Einzelne Aminosäuren

wurden ausgetauscht, um eine Ladungsumkehr zu erzielen oder um die Ladung zu neutralisieren.^[164-166] Die Untersuchungen ergaben, dass OmpF trotz der Mutationen weiterhin eine Spannungsabhängigkeit des Öffnens bzw. des Schließens zeigte. Der hierdurch verursachte Effekt äußerte sich zum einen in einer erhöhten bzw. erniedrigten kritischen Spannung V_c , zum anderen in einer veränderten Selektivität für einzelne Ionen.

Weitere Hypothesen machen die Bewegung der extrazellulären Schleifen in die Pore hinein für das Schließen von OmpF verantwortlich, die durch AFM-Messungen (*atomic force microscope*) an zweidimensionalen OmpF-Kristallen bei einer angelegten transmembranären Spannung beobachtet wurden.^[167] Einer anderen Theorie zur Folge ist das spannungsabhängige Schließen wiederum eine intrinsische Eigenschaft der β -Fass-artigen Porine, da diese sich trotz aller Unterschiedlichkeiten gleichermaßen verhalten, manchen Proteinen jedoch die L3 Schleife fehlt.^[168] Dies beruht auf der Idee, dass das elektrische Feld innerhalb der Pore, das für den Ionentransport verantwortlich ist, durch die angelegte Spannung gestört wird.

Für OmpF wurde eine Vorzugsrichtung für den Einbau in die Membran berichtet, wenn das Protein nur von einer Seite in die Messapparatur hinzugegeben wird, wobei die Orientierung unklar ist.^[169-171] Dieser Effekt der Asymmetrie bei positiv oder negativ angelegter Spannung wurde systematisch untersucht,^[149] indem ein Salzgradient in der BLM-Messkammer unter Verwendung einer 0.1/1 M KCl-Konzentration aufgebaut wurde und das Protein von nur einer Seite zugegeben wurde. Es wurde eine schwache Konzentrationsabhängigkeit gefunden, und bei Verwendung äquimolarer Lösungen in der Messkammer war der Effekt minimal. Die pH-Abhängigkeit hingegen wies einen drastischen Einfluss bei extrem sauren oder basischen pH-Werten auf, während im pH-Bereich von 5 – 9 die Abhängigkeit weniger stark ausgeprägt war. Dieser Effekt wurde auf eine asymmetrische Verteilung ionisierbarer Aminosäuren zurückgeführt.^[149, 172]

In der vorliegenden Arbeit wurde die elektrophysiologische Charakterisierung in einer Messanordnung durchgeführt, bei der in beiden Kammern die gleiche KCl-Konzentration von 150 mM herrschte und der pH-Wert bei 7.3 lag, sodass hier eine ausgeprägte Asymmetrie der Leitfähigkeit zwischen positivem und negativem Potentialbereich nicht zu erwarten war. OmpF wurde von der *trans*-Seite in die Messkammer zugegeben, und nach Abschluss der Messung wurde die Membran zerstört und neu gebildet. Die in die Pore inkorporierten synthetischen Modulatoren sollten keinen großen Einfluss auf die Vorzugsrichtung des

Einbaus haben, da die Insertion durch die Ober- bzw. Unterseite der Poren vermittelt wird und die Zusammensetzung der polaren Aminosäuren konstant bleibt.

Für OmpF wurden sehr viele z. T. verschiedene Leitfähigkeitswerte berichtet, die auf unterschiedlichen Probenpräparationen, Messbedingungen und –methoden (*patch clamp* vs. BLM) beruhten und folglich schwierig zu vergleichen sind. In einer Veröffentlichung von Baslé *et al.* wurde dieser Sachverhalt systematisch untersucht, und die verwendeten Standardbedingungen wurden in dieser Arbeit übernommen.^[150] Ebenso werden bei der Salkonzentration von 150 mM KCl elektrostatische Effekte innerhalb der Pore, die durch die Verknüpfung synthetischer Modulatoren evtl. hervorgerufen werden können, überdeckt.^[149]

Die angelegte Spannung wurde bei den Messungen zwischen -160 und +160 mV variiert. Bei den Messungen oberhalb der kritischen Spannung V_c wurden nach kurzer Zeit von einer halben bis zwei Minuten Trimer-Schließereignisse beobachtet, da die Schließ-Wahrscheinlichkeit deutlich ansteigt. Hingegen zeigten Einzelkanäle bei Spannungen < 130 mV einen minutenlangen Offenzustand, ohne dass sich weitere Kanäle einbauten bzw. Monomere schlossen.

5.3.2. Hybride OmpF-Moleküle zeugen von einer starken Heterogenität

Unmodifiziertes OmpF, das entweder aus der Membran gewonnen oder durch Rückfaltung erzeugt wurde, zeigte nach Einbau in die künstliche Membran eine ruhige Spur. Damit ist ein Zustand gemeint, bei dem es zu einer stabilen Öffnung der Monomere kommt und die Pore nicht schnell zwischen zwei Zuständen hin und her wechselt. Dieser Zustand wird häufig als „Flickern“ bezeichnet und ist z. B. typisch für das monomere OmpG (**Abb. 5.3**).^[173] In der Kristallstruktur von OmpG (siehe Kapitel 1.1.3) wurde die Schleife L6 identifiziert, die sich pH-abhängig in die Pore hineinfaltet und so den Kanal verschließen kann.^[49] Höchst wahrscheinlich spielt die konformationelle Freiheit der Schleife L6 eine zentrale Rolle beim schnellen Öffnen und Schließen der Pore, oder die Pore könnte alternativ in der Membran eine gestauchte und gestreckte Form entlang der z-Achse einnehmen.

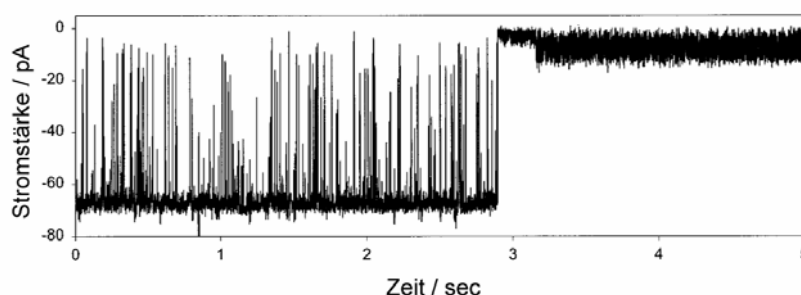


Abbildung 5.3: Stromspur von OmpG, die das Flickern illustriert. Aufgenommen bei -40 mV in 1 M NaCl, 5 mM HEPES; pH 7.5.^[173]

Diese Flicker-Ereignisse wurden nicht für die in der Einleitung beschriebenen modifizierten Ionenkanäle (α -Hämolysin, *Shaker* H4 K⁺-Kanal) berichtet.^[87, 90, 95, 174] Im Gegensatz hierzu zeigten aber alle modifizierten OmpF-Poren, in die über verschiedene Methoden synthetische Modulatoren angeknüpft wurden, bei einigen Messungen Flicker-Ereignisse. Unmodifiziertes OmpF jedoch zeigt dieses schnelle Öffnen und Schließen nicht. **Abb. 5.4 A** zeigt eine repräsentative Spur des unmodifizierten nativen OmpF nach der Rückfaltung, **Abb. 5.4 B** zeigt das Schließen des Dansyl-modifizierten OmpF-Trimers **25**, bei der kein Flickern zu beobachten ist. In **Abb. 5.4 C** hingegen ist die Spur des Hybrids gezeigt, bei dem starkes Flickern über einen minutenlangen Zeitraum beobachtbar ist. Das Trimer zeigt eine konzertierte Öffnung aller drei Monomere, aber nur ein Monomer zeigt dieses Verhalten.

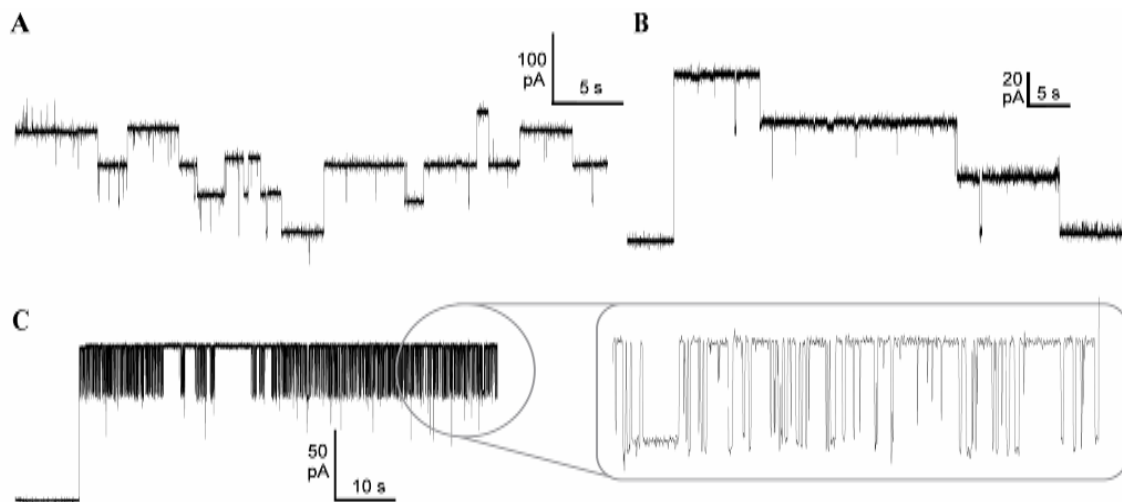


Abbildung 5.4: BLM-Messspuren von OmpF. **(A)** Wildtyp, rückgefaltet, aufgenommen bei einer Spannung von +160 mV. **(B)** Trimer-Schließereignis des Dansyl-modifizierten Hybrids OmpF-Cys16-19 (**25**), über S-Alkylierung erzeugt, aufgezeichnet bei +140 mV. **(C)** Die Trimer-Öffnung des Hybrids, gemessen bei +120 mV, zeigt Flickern in Höhe einer Monomerstufe mit 45 pA bei einem Gesamtstromfluss von 130 pA.

In **Abb. 5.5** ist das Flickern des Kronenether-modifizierten OmpF **26** dargestellt. Beide Spuren wurden bei gleicher Spannung aufgenommen und zeigen einen Ausschnitt aus der erhaltenen Messspur. Unter **A** ist eine sehr ruhige Spur gezeigt, die üblicherweise beobachtet wurde, während unter **B** starkes Flickern von etwa 40 pA zu beobachten ist. In der abgebildeten Messung entspricht dies etwa dem Schließen und Öffnen einer Monomerstufe.

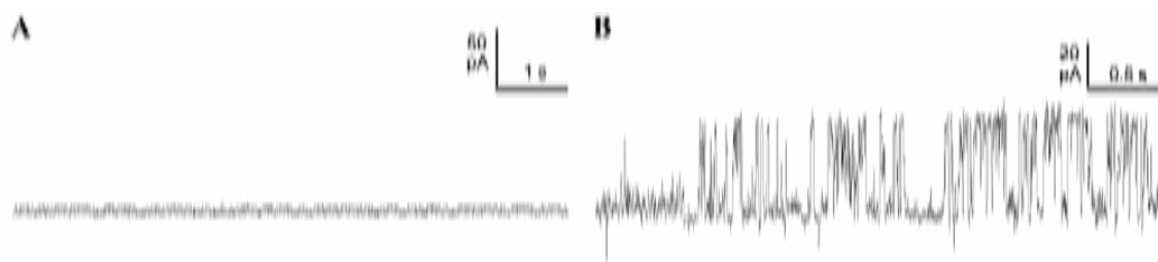


Abbildung 5.5: Vergleich von zwei Messspuren des Kronenether-modifizierten OmpF-Hybrids **26**. Beide Spuren wurden bei einer Spannung von -120 mV aufgezeichnet und repräsentieren Ausschnitte nach Einbau eines oder mehrerer Trimere. Das vermessene Protein stammt aus demselben *Batch*.

Neben dem Flickern in einzelnen Messspuren zeigt sich die Heterogenität ebenfalls in den erhaltenen Trimer-Leitfähigkeiten verschiedener Hybride (siehe folgendes Kapitel). Die massenspektrometrische Analyse ergab einen nahezu quantitativen Umsatz (90 - 99%) der über S-Alkylierung und [3+2]-Click-Reaktion modifizierten OmpF-Hybride **25** und **26**, sodass als Ursache hierfür nicht die Messung von modifizierten / unmodifizierten Hybriden primär in Betracht kommt. Diese gemischten Hybride können durchaus auftreten, sind aber durch die angewendete Bestimmungsmethode vernachlässigbar, da „falsche“ Messwerte aufgrund der hohen Datenpunktezahl nur einen minder-signifikanten Beitrag zur Ermittlung der Leitfähigkeit leisten.

Als Ursache des Flickerns und der beobachteten Varianz der Leitfähigkeiten kann die erhaltene Kristallstruktur der hybriden OmpF-Pore **26** herangezogen werden. Der Kronenether ist hier durch elektrostatische Wechselwirkungen der Sauerstoff-Atome des Polyoxyethylen-Rings mit den sauren und basischen Resten der L3-Schleife stabilisiert. Dieser Zustand im Kristall entspricht nicht zwingend dem unter den Messbedingungen vorliegenden dynamischen Zustand, sondern eher einer Momentaufnahme. Weiterhin wird der Kronenether auch durch das in der Elektronendichte gefundene HEPES-Molekül stabilisiert. Verschiedene konformationelle Orientierungen der Dibenzo-18-Krone-6 sind in Betracht zu ziehen, die eine Änderung der Leitfähigkeit bewirken. **Abb. 5.6** zeigt die kristallographisch gefundene Orientierung des Kronenethers in orange, die einer *inward*-

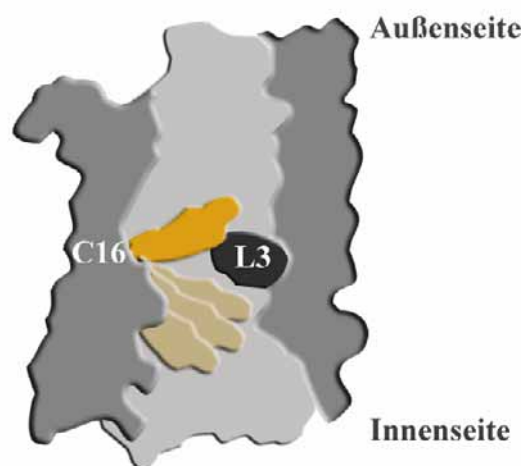


Abbildung 5.6: Schematische Seitenansicht der OmpF-Pore mit gefundener *inward*- Orientierung des Kronenethers (orange); mögliche *outward*- Konformationen (gelb).

kristallographisch gefundene Orientierung des Kronenethers in orange, die einer *inward*-

Orientierung entspricht. Weitere konformationelle Orientierungen des Kronenethers, die einer *outward*-Orientierung entsprechen würden, sind denkbar (in gelb dargestellt). Bei diesen wäre der Stromfluss durch die Pore weniger bis nicht merklich vermindert.

Zur Klärung der Heterogenität sind weitere Experimente erforderlich. Zum einen könnten größere Modulatoren in die Pore eingebracht werden, zum anderen könnte eine 2-Punkt-Anknüpfung synthetischer Modulatoren eine fixierte Konformation zur Folge haben (siehe Kapitel 5.6). Hierdurch sollte eine einheitliche Leitfähigkeit erhalten werden. Wichtig ist bei den Anknüpfungsreaktionen ein quantitativer Umsatz, um die Bildung gemischter Hybride zu verhindern.

5.3.3. Die Art der Anknüpfung von synthetischen Modulatoren beeinflusst das Messergebnis

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Strategien zur Anknüpfung synthetischer Modulatoren in die OmpF-Pore angewendet. Es stellte sich heraus, dass neben der Lage und der Beschaffenheit des Modulators in der Pore die Art der Anknüpfung einen entscheidenden Einfluss auf Modulation des Stromflusses ausübt. Bei einem Vergleich der beiden OmpF-Hybride **28** und **25**, an die das Dansyl-Azid bzw. das -Iodacetamid angeknüpft wurden, zeigte sich im Falle der [3+2]-Click-Reaktion keine Änderung der Leitfähigkeit, während das über S-Alkylierung eingeführte Dansyl-Derivat eine Reduktion der Leitfähigkeit von 16% bewirkte (**Abb. 5.7**).

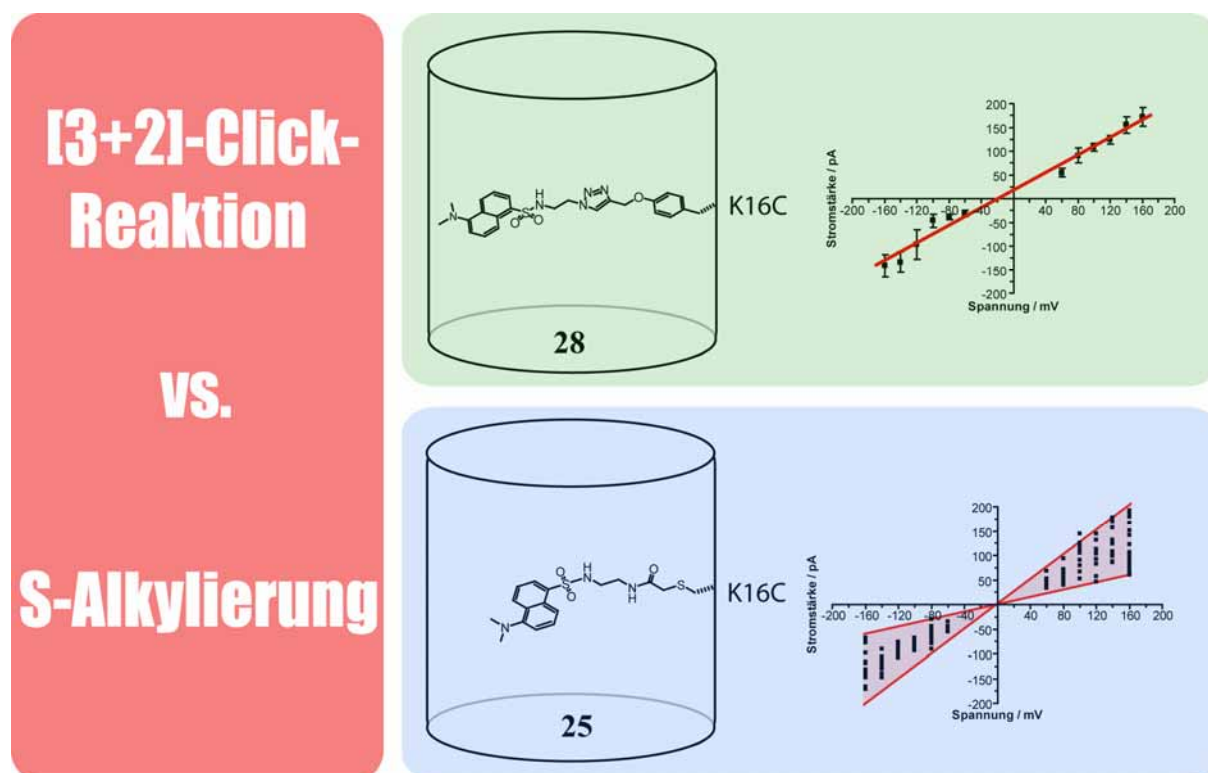


Abbildung 5.7: Schema des OmpF-Hybrids **28** (durch NCL und [3+2]-Click-Reaktion, Route a) erzeugt) und des Hybrids **25** (durch S-Alkylierung an OmpF-K16C erzeugt) sowie deren I/U-Kurve bzw. Messpunkte.

Die Größe der beiden Modulatoren unterscheidet sich nicht genügend (451 vs. 377 Da), um diesen Befund durch den Größenunterschied alleine zu erklären. Offensichtlich kann der Modulator von **28** die zentrale Engstelle von OmpF nicht besetzen und haftet höchstwahrscheinlich an der Poreninnenwand an, während in **25** die Engstelle der Pore zumindest partiell blockiert ist.

Verbindung **28**, die durch NCL in Kombination mit [3+2]-Click-Reaktion erzeugt wurde, weicht im negativen Potentialbereich deutlich von der I/U-Linearität ab. Möglicherweise sind dafür sekundäre Wechselwirkungen mit der Schleife L3 verantwortlich sowie Unterschiede im Dipolmoment und der Partialladung der beiden Modulatoren. **Abb. 5.8** illustriert zwei unterschiedliche Orientierungen des Modulators innerhalb der OmpF-Pore, die wahlweise durch die Rückfaltung erhalten werden können. Ob es hierbei eine Vorzugsorientierung gibt, kann nicht eindeutig gesagt werden. Denkbar ist es jedenfalls, da für die jeweilige Orientierung die sekundären Wechselwirkungen unterschiedlich stark ausgeprägt sein können. So wurde im Falle der Röntgenstruktur des Kronenether-modifizierten OmpF nur in einem Kristall Elektronendichte für den Modulator gefunden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass prinzipiell beide Zustände erhalten werden können. Der vorliegende Zustand kann durch sterische Interferenzen mit der Schleife L3 in einer Orientierung arretiert sein.

Die beobachtete Nichtlinearität im negativen Potentialbereich des Dansyl-modifizierten Hybrids kann unter verschiedenen Annahmen durch das Modell aus **Abb. 5.8** erklärt werden:

- OmpF lagert sich gerichtet in die Membran ein. Denkbar ist eine Richtung der Membraninsertion, bei der die hydrophilen und kurzen β -Strang-verbindenden Schleifen, die auf der periplasmatischen Seite der Membran liegen, zuerst die Membran durchdringen.
- Für die Lage des Modulators innerhalb der Pore gibt es eine Vorzugsrichtung, die durch sekundäre Wechselwirkungen bevorzugt gebildet wird. Beide Orientierungen sind arretiert und können sich nicht nachträglich ineinander umwandeln, da dieses durch die Schleife L3 behindert wird.

Je nach angelegtem Membranpotential fließen mit schwacher Präferenz K^+ -Ionen sowie Cl^- -Ionen durch den Kanal. Für das Potential A und B liegen unterschiedliche Blockzustände vor, wie aus der I/U-Kurve ersichtlich wird.

Das Potential A entspricht dem positiven Messbereich der I/U-Kurve, hier ist die Messelektrode positiv geladen und befindet sich auf der *cis*-Seite der Membran. Das Protein wird immer in *trans* in die Kammer hinzugegeben und kann wie bereits genannt und in **Abb. 5.8** gezeigt in die Membran insertieren. Unter der Annahme, dass Orientierung I bevorzugt vorliegt, kann der Modulator den Ionendurchtrittsweg nicht oder kaum blockieren, sodass ein linearer I/U-Zusammenhang bestehen würde.

Wird nun das Potential B angelegt, was einer negativ geladenen Messelektrode entspricht, kann der Modulator in Orientierung I partiell den Ionendurchtrittsweg blockieren, sodass die Nichtlinearität der I/U-Kurve auftritt. Für den Fall, dass die Orientierung II die bevorzugte ist, müsste im positiven Messbereich die Nichtlinearität auftreten, die aber nicht beobachtet wird.

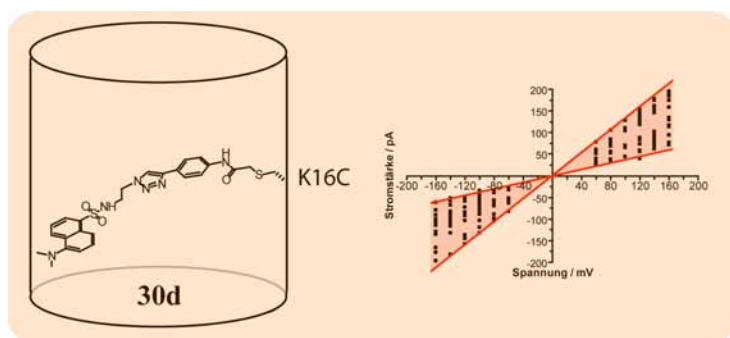


Abbildung 5.9: Schema des Hybrids **30d** (durch S-Alkylierung an OmpF-K16C mit **18** sowie [3+2]-Click-Reaktion mit **13** erzeugt) sowie Graph der I/U-Abhängigkeit.

Weiterhin unterscheiden sich die drei weiteren untersuchten Hybride signifikant voneinander, obwohl alle über denselben Modulator verfügen und die Lage der eingeführten Cysteine nur geringfügig versetzt ist. So weist das Hybrid **30b** eine verminderte Reduktion der Leitfähigkeit von 15% auf, die wie im Hybrid **30d** von einer starken Heterogenität begleitet ist (Abb. 5.10). Die Hybride **30a** und **30c** zeigen ebenfalls eine Reduktion von 9% bzw. 17%, verhalten sich aber linear. Aus den erhaltenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine relativ kleine Änderung des Anknüpfungsortes einen drastischen Effekt der Stromflussmodulation hervorrufen kann, da bei geeigneter Lage des Modulators durch elektrostatische und hydrophobe Interaktionen mit der Pore ein homogener Zustand erhalten werden kann. Da es sich nicht genau vorhersagen lässt, wie stark sich die sekundären Wechselwirkungen zwischen Modulator und Pore an zwei unterschiedlichen Positionen innerhalb der Pore unterscheiden, ist es für die zukünftige Erzeugung hybrider Poren unabdingbar, die Modulatoren an verschiedenen Punkten anzuknüpfen und deren Einfluss zu bestimmen.

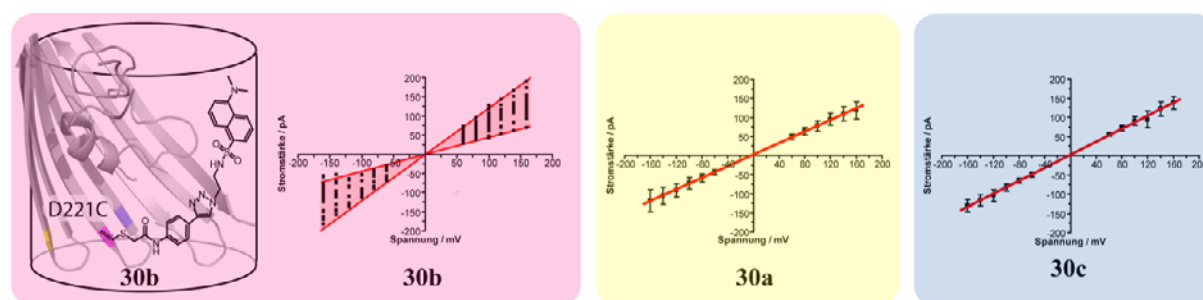


Abbildung 5.10: Schema des OmpF-Hybrids **30b** (magenta), das durch S-Alkylierung an OmpF-D221C mit **18** sowie [3+2]-Click-Reaktion mit **13** erzeugt wurde sowie dessen I/U-Abhängigkeit. Analog wurde das Hybrid **30a** (OmpF-Cys181-**18-13**, gelb) und **30c** (OmpF-Cys226-**18-13**, blau) erzeugt.

5.4. *Alternative Strategien zur Erzeugung hybrider OmpF-Poren*

Neben der in dieser Arbeit vorgestellten Methode zur Erzeugung von OmpF-Hybriden wurde im Rahmen eines Kollaborationsprojektes in der Arbeitsgruppe von Prof. Mootz (Universität Dortmund) eine alternative Strategie, das *protein trans-splicing*, angewendet. *Protein trans-splicing* wurde 1990 entdeckt,^[175, 176] in allen drei Domänen des Lebens gefunden (*Archaea*, *Bacteria*, *Eukarya*) und beschreibt eine post-translationale Proteinmodifikation.^[177] Hierbei ist in einen DNA-Abschnitt, das ein bestimmtes Gen codiert, eine unterbrechende DNA-Sequenz integriert. Nach Transkription in die mRNA wird ein *precursor*-Protein erzeugt, dass anschließend in einem selbst-katalysierten Schritt die beiden flankierenden Polypeptidketten miteinander verknüpft (die Exteine), während das unterbrechende Fragment (das Intein) ausgeschnitten wird. Für diese intramolekulare Reaktion werden keine weiteren Enzyme oder Kofaktoren benötigt.

In der Gruppe von Prof. Mootz wurde das aus dem thermophilen Organismus *Pyrococcus sp.* GB-D stammende Pol-Intein verwendet, das selbst unter denaturierenden Bedingungen von 6 M Harnstoff aktiv ist.^[178] OmpF wurde im Bereich der Schleifenregion L1 geteilt und der N- bzw. C-terminale Bereich an das ebenfalls geteilte Intein angebracht, das eine Länge von 537 Aminosäuren aufweist. Beide Fragmente wurden separat rekombinant überproduziert, gereinigt und in Harnstoff solubilisiert. Durch die *trans-splicing*-Reaktion wurde OmpF in seiner nativen Sequenz erhalten. Der Vorteil dieser Strategie ist, dass ein OmpF-Extein unabhängig vom anderen Extein modifiziert werden kann, und darüber hinaus können in beiden Hälften gezielt (unterschiedliche) Modulatoren eingeführt werden.

Durch die Anwendung dieser Methode wurde ein OmpF-Hybrid generiert, indem ein an Position 16 eingeführtes Cystein mit einer Iodacetamid-aktivierten Monobenzo-18-Krone-6 umgesetzt wurde (**Abb. 5.11 A**). Die Rückfaltung des Spleiß-Produktes wurde in DMPC/DDM-Vesikeln durchgeführt. Es zeigte sich, dass durch die Aufreinigung ebenfalls kontaminierende Proteine nur unvollständig abgetrennt werden konnten (**Abb. 5.11 B**, Bande g). Die funktionelle Charakterisierung der Reaktionsprodukte wurde mittels der BLM-Methode durchgeführt, bei der bei +140 mV einzelne Trimer-Schließereignisse ausgewertet wurden. Dies ergab einen für Wildtyp OmpF typischen Leitfähigkeitswert von 1.17 ± 0.07 nS, während für das hybride OmpF-Molekül ein um 43% verminderter Wert von 0.64 ± 0.24 nS bestimmt wurde, sodass von einer partiellen Blockade der Pore ausgegangen werden kann.

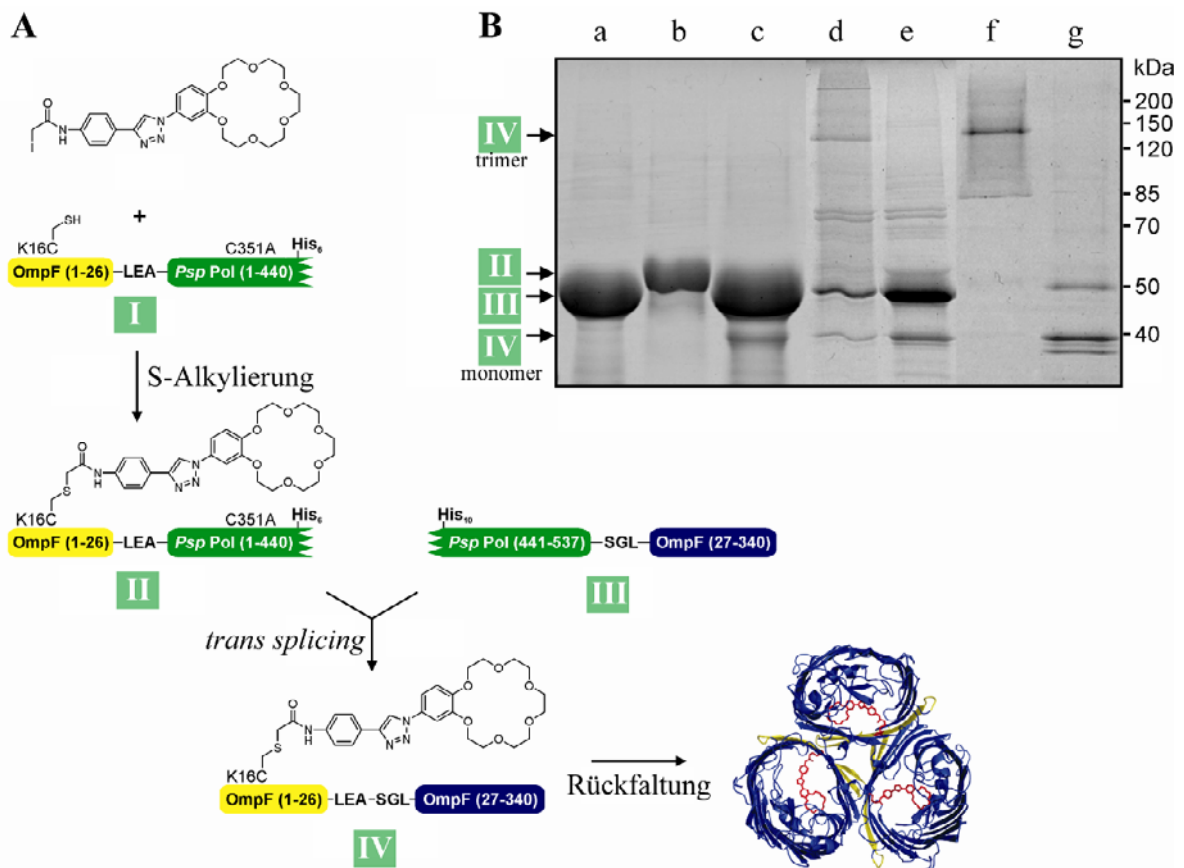


Abbildung 5.11: Protein trans-splicing basierte Strategie zur Erzeugung von OmpF, modifiziert mit der Monobenzocrown-6. (A) Die Iodacetamid-aktivierte Kronenether wurde durch S-Alkylierung an OmpF^N-Extein-K16C **I** angeknüpft, das an das Pol-Intein^N fusioniert war. Dieses Fragment **II** wurde zusammen mit dem Extein^C/Intein^C-Fragment **III** gespleißt, resultierend in dem vollständigem OmpF **IV**. Durch Rückfaltung wurde das trimere OmpF erhalten. (B) SDS-PAGE der Reaktionsprodukte. a, Fragment **III**; b, Fragment **II**; c, Produkt der Spleiß-Reaktion **IV**; d, Rückfaltungsmix von **IV** nach Reinigung und Konzentrierung; e, Probe d nach Denaturierung; f, SDS-PAGE extrahiertes rückgefaltetes Produkt **IV**; g, denaturierte Probe f.^[178]

Diese Methode stellt einen interessanten Zugang zur Erzeugung hybrider Ionenkanäle dar, bei der insbesondere die Möglichkeit, beide Exteine getrennt voneinander zu modifizieren, von Vorteil ist. Ein Nachteil der Spleiß-Methode ist die geringe Ausbeute von 30 – 40% der Reaktion, die eine strukturelle Charakterisierung der Hybride aufgrund der erforderlichen Quantitäten erschwert, sowie die Tatsache, dass routinemäßig nur proteinogene Aminosäuren als funktionelle Gruppen inkorporiert werden können.

5.5. OmpG: ein alternatives Modellsystem für hybride Ionenkanäle

Das monomere und 34 kDa-große Protein OmpG stellt neben dem trimeren OmpF ebenfalls ein viel versprechendes Proteintemplat zur Erzeugung hybrider Membranproteine dar. Dieses Protein ist in unserer Arbeitsgruppe derzeit ebenfalls Gegenstand intensiver

Forschungsanstrengungen und eine zu OmpF vergleichbare Strategie wird auf OmpG angewendet.^[179, 180] Es stellte sich heraus, dass OmpG in Form von *inclusion bodies* ebenfalls sehr gut überexprimierbar war.^[179] Die Rückfaltung der in Harnstoff solubilisierten *inclusion bodies* durch schnelle Verdünnung in dem Detergenz *n*-Octyl- β -D-glucopyranosid erfolgte mit sehr guten Ausbeuten von bis zu 90%. Darüber hinaus weist OmpG die typischen Eigenschaften der β -Fass-artigen Porine auf und zeigt in der SDS-PAGE einen Laufunterschied von rund 7 kDa zwischen nativem (~28 kDa) und denaturiertem (~35 kDa) Zustand. Nach Analyse der publizierten Röntgenstrukturen^[49, 181] wurden geeignete Schnittstellen ausfindig gemacht, um das Protein in zwei Fragmente zu zerlegen.

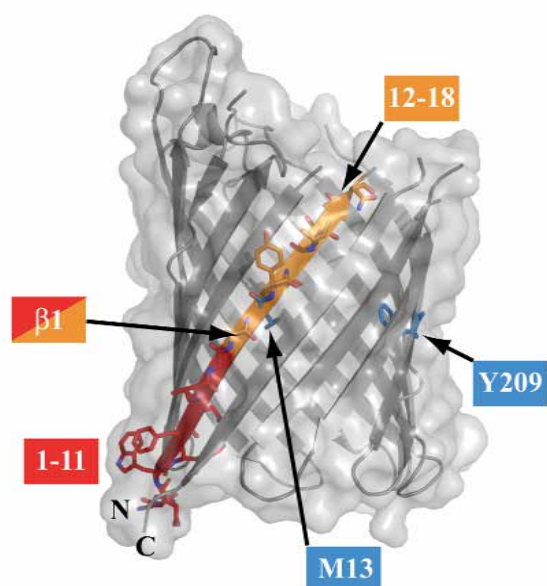


Abbildung 5.12: Seitenansicht auf OmpG (PDB-Code: 2F1C),^[181] bei dem die Schleifenregionen aufgrund fehlender Elektronendichte nicht abgebildet sind. Die festphasensynthetisch erzeugten Peptide sind farblich markiert: 11er Peptid (rot); 18er (rot+orange). Die Reste M13 und Y209 sind in blau dargestellt und wurden gegen Cystein-Reste ausgetauscht.

Das N-terminale Fragment besaß eine Länge von 11 bzw. von 18 Aminosäuren und wurde festphasensynthetisch erzeugt. Durch Anwendung der NCL-Reaktion wurde dieses Oligopeptid an das rekombinant erzeugte C-terminale Deletionsfragment gekuppelt und zurückgefaltet (**Abb. 5.12** zeigt die beiden Fragmente). Der Austausch von Asn9 im kürzeren und Met13 im längeren Peptidfragment gegen den Propargyltyrosinetherbaustein **II** ermöglichte eine Kupfer-katalysierte [3+2]-Click-Chemie mit den ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Azido-Bausteinen. Nach ortsspezifischer Mutagenese der Reste Met13 und Tyr209 gegen ein Cystein wurden S-Alkylierungsreaktionen durchgeführt.

Ein deutlicher Vorteil von OmpG gegenüber OmpF ist die Synthese kürzerer Peptidfragmente für die NCL, wodurch die Ausbeute der SPPS erhöht wird. Das Vorliegen als Monomer von OmpG ist der größte Vorteil gegenüber OmpF: es können keine gemischten Hybride entstehen, entweder ist die Pore modifiziert oder nicht, und bei der elektrophysiologischen

Charakterisierung können die BLM-Spuren deutlich leichter ausgewertet werden. Einzelne OmpF-Kanäle weisen auch eine Varianz in der gemessenen Leitfähigkeit auf, die für OmpG weniger ausgeprägt ist.

Für die Kristallisation von OmpG wurde das Protein entweder aus der äußeren Membran isoliert oder durch Rückfaltung von *inclusion bodies* gewonnen. In unserer Gruppe wurden bereits Kristalle des Wildtyps und eines über S-Alkylierung gewonnenen Dansyl-Hybrids bis zu einer Auflösung von 2.4 Å röntgenkristallographisch vermessen, was der Auflösung der bereits veröffentlichten Strukturen entspricht.^[49, 181]

Mittels BLM-Methode wurde die elektrophysiologische Charakterisierung der OmpG-Hybride inkl. der Referenz-Moleküle durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass der Leitfähigkeitswert für das native rückgefaltete OmpG mit 0.72 ± 0.01 nS dem aus der Literatur bekannten Wert entsprach, auch die Cystein-Referenzproteine zeigten keine signifikante Abweichung. Die Umsetzung von OmpG-M13C bzw. Y209C mit Dansyl-Iodacetamid **19** ergab jeweils eine Reduktion der Leitfähigkeit von rund 20 – 30%. Die Umsetzung der Cysteinmutanten mit Iodacetamid-Alkin-Linker **18** und anschließender [3+2]-Click-Reaktion mit **13** führte ebenfalls zu einer signifikanten Leitfähigkeitsreduktion von 18% bis 45%. Aufgrund der Varianz einzelner Messungen sind die erhaltenen Ergebnisse jedoch erneut zu verifizieren, bevor ein endgültiger Wert genannt werden kann.^[180]

5.6. Anwendungsbeispiele modifizierter Ionenkanäle

Modifizierte Ionenkanäle kommen in verschiedensten Anwendungsbereichen zum Einsatz. Ein prominenter Bereich ist der medizinisch-pharmazeutische Sektor. Hier könnten lichtgesteuerte spannungsabhängige K⁺-Kanäle zur Behandlung von neuronalen Schäden und Degenerationen eingesetzt werden, während lichtgesteuerte ionotrope Glutamatrezeptoren in Nervenzellen eingesetzt werden könnten, um die neuronale Aktivität zu steuern. Modifizierte und pH- und/oder Licht-steuerbare MscL-Kanäle könnten bei der Freisetzung von Wirkstoffen durch Liposomen eine wichtige Rolle spielen.^[182]

In 2002 wurde das sog. *channelrhodopsin-1* entdeckt, das aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* stammt.^[183] Ein Jahr später wurde in dem gleichen Organismus *channelrhodopsin-2* entdeckt.^[184] Beide Proteine gehören zu den Opsinen, die Retinal als Chromophor verwenden. Es sind unspezifische Kationenkanäle, die durch Licht gesteuert werden und für Phototaxis verantwortlich sind. Das *channelrhodopsin-2* wurde in Neuronen von transgenen Tieren exprimiert und ihr Verhalten nach Bestrahlung mit Licht untersucht.^[185, 186] Die Sehfunktion von blinden Mäusen konnte ebenfalls partiell wieder

hergestellt werden, was ein vielversprechender Ansatz zur Wiederherstellung der Sehkraft in Menschen darstellt.^[187]

Angepasste Ionenkanäle können helfen bösartige Zellen zu töten, indem sie die Zielzellen selektiv permeabel für cytotoxische Wirkstoffe machen. Das komplett neu synthetisierte *small globular protein* (SGP), das als tetrameres α -helikales Bündel eine Pore in der Membran ausbildet, wurde positiv auf anti-Tumor-Aktivität in Mäusen getestet.^[188]

Die Fusion eines aus Staphylococcen stammenden Pheromons an die Domäne des porenbildenden Colicins Ia führte zur Bildung eines antibiotisch-aktiven Peptids, dessen Aktivität durch *in vivo* Experimente bestätigt wurde.^[189]

Des Weiteren können Moleküle, die in die Zelle aufgenommen werden sollen, durch Poren eingeschleust werden, die durch externe Stimuli wie z. B. zweiwertige Metallionen wie Zn(II) gesteuert werden. Das aus *Staphylococcus aureus* stammende α -Toxin ist mit einem Histidin-Schalter ausgestattet, der nach Aktivierung die Plasmamembran permeabel für Moleküle bis 1 kDa machte. Die Zellen wurden im Anschluss wieder verschlossen, indem die Metallionen durch Waschen oder EDTA-Zugabe entfernt wurden.^[190]

Durch *stochastic sensing* können modifizierte Poren, wie z. B. α -Hämolysin modifiziert mit Cyclodextrin, in vielfältigen Anwendungen eingesetzt werden. So wurden verschiedene Analyt-Moleküle detektiert (Anionen, Kationen, organische Moleküle, Polymere, Nukleinsäuren, Proteine) und chemische Reaktionen nachverfolgt (siehe Kapitel 1.2.1). Durch die Anknüpfung eines DNA-Oligomers könnte eine moderne Art der DNA-Sequenzierung ermöglicht werden, die Detektion eines passenden DNA-Oligonukleotids wurde bereits realisiert (**Abb. 5.13**).^[191, 192] Aus den erhaltenen Daten sowie einer temperaturabhängigen Messanordnung können weitere Parameter der DNA-Interaktion bestimmt werden, wie z. B. die Standard-Entropie und -Enthalpie.

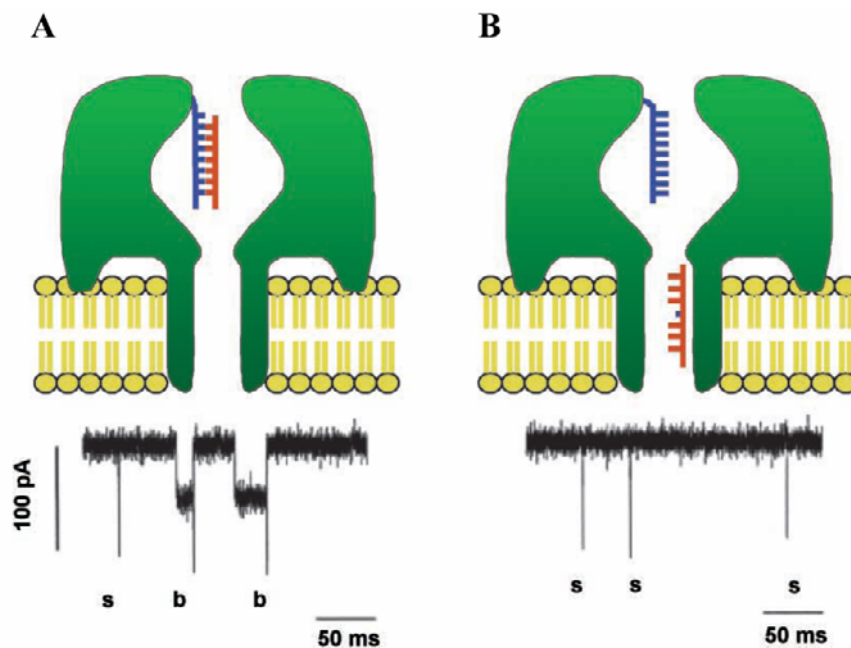


Abbildung 5.13: Modifiziertes α -Hämolysin, an das ein DNA-Oligonukleotid (Octamer) angehängen wurde. (A) Nach Zugabe des komplementären DNA-Stranges ändert sich das Messsignal. (B) Eine einzige nicht-komplementäre Base reicht aus, um die Bildung des Doppelstrangs zu verhindern. s steht für ein kurzes (*short*) Ereignis, bei dem ein Oligonukleotid die Pore passiert; b für Bildung der Duplex-Struktur.

Gramicidin A, das am C-terminus über einen Aminocapryl-Adapter biotinyliert wurde, konnte als Sensor für die Detektion von (Strept)avidin eingesetzt werden.^[193] Diese Einheit stellt die zentrale Komponente des AMBRI[®] „*Ion channel switch*TM“-Biosensors dar.^[194] Gramicidin A ist hierbei in eine Phospholipiddoppelschicht eingebettet, die sich über einer Goldoberfläche als Elektrode befindet. In der Membran existieren die beiden gA-Monomere, von denen das der Goldoberfläche zugewandte an dieser fixiert ist. Das zweite mobile gA-Monomer kann frei in der Membran diffundieren; wenn sich beide Monomere finden kommt es zu einem Stromfluss. An letzterem Monomer ist eine Rezeptoreinheit (variable Einheit, z. B. ein Antikörper) über eine Streptavidin-Biotin-Verknüpfung angebracht. Durch Bindung eines Analytmoleküls an den Rezeptor wird die Bewegungsfreiheit des Monomers eingeschränkt, die leitfähige Spezies bildet sich nicht aus und die gesamte Leitfähigkeit aller Kanäle wird proportional zu der Analytkonzentration reduziert.

Eine wichtige und viel versprechende Anwendungsmöglichkeit ist die Entwicklung von Ionenkanal-basierten Biosensoren. Duran nutzte einen Aufbau (siehe **Abb. 5.14**), bei dem auf einer Sensorschicht aus Gold mit einer Größe von $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ eine Lipidschicht aufgebracht wurde.^[195] In Vesikel solubilisierte Ionenkanäle wurden durch Fusion der Vesikel mit der Membran eingeführt. Ein Pufferreservoir zwischen Goldschicht und Membran ermöglichte den Austausch der Ionen durch den Kanal mit dem externen Puffer. In

Abwesenheit von Ionenkanälen wurde kein Stromfluss detektiert, der nach Zugabe der Ionenkanäle im pA-Bereich messbar war. Mittels *stochastic sensing* konnten Analytmoleküle in mikromolarer Konzentration detektiert werden.

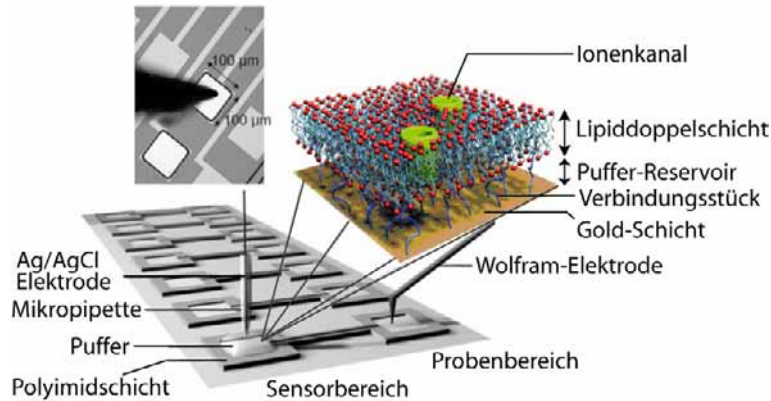


Abbildung 5.14: Schematischer Aufbau eines Biosensors. Der Probenbereich ist durch einen dünnen Goldstreifen mit dem Sensorbereich verbunden. Das Bild oben links zeigt eine mikroskopische Aufnahme auf das Array.^[195]

Duran verwendete zwei unterschiedliche Kanäle als Modellsysteme: zum einen den Ca^{2+} -aktivierten K^{+} -Kanal (BK-Kanal), der für die Reizweiterleitung entlang von Nervenzellen verantwortlich ist, und zum anderen den synthetischen Kanal M2 δ , der auf dem Nicotin-Acetylcholinrezeptor basiert. Der BK-Kanal wurde als Biosensor für Tetraethylammonium getestet, und der M2 δ -Kanal als Sensor für das Pestizid und Nervengift Triethylphosphat (TEP), das diesen Rezeptor inhibiert. In beiden Fällen konnte eine verminderte Leitfähigkeit beobachtet werden. Für den M2 δ -Sensor wurde mit guter Reproduzierbarkeit durch Zugabe von 6 μM TEP eine Inhibition des Kanals mit einer Dauer von 15 – 20 s erreicht (**Abb. 5.15**), die durch Austausch der Pufferlösung reversibel war.

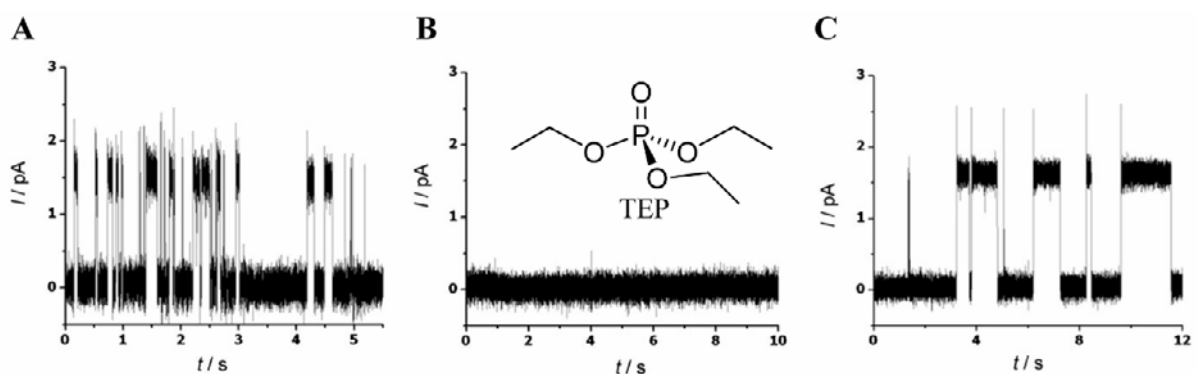


Abbildung 5.15: Einzelkanalmessungen des M2 δ -Biosensors bei einer angelegten Spannung von 100 mV. (A) Kontrollspur ohne Zugabe von Triethylphosphat (TEP). (B) Nach Zugabe von 6 μM TEP. (C) Wiederherstellung des nicht-inhibierten Zustandes nach waschen und Pufferwechsel.

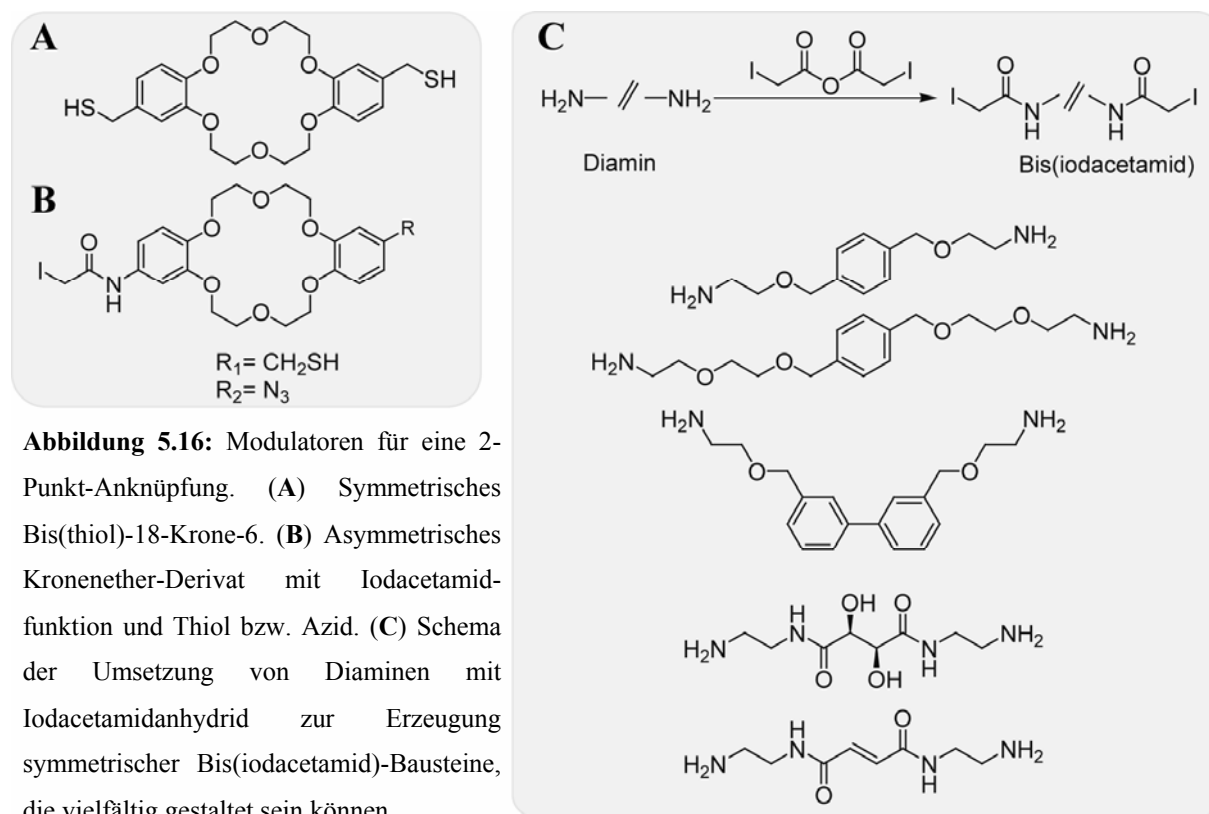
Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Ionenkanäle besteht im Einsatz als Halbleiter in der Elektronik. Die Größe der konventionellen Halbleiter nimmt derzeit weiter ab und beginnt in

den nano-Größenbereich vorzustoßen, in deren Bereich ebenso biologische Makromoleküle angesiedelt sind. Asenov und Kollegen koppelten einen sog. MOSFET (*Metal Oxide Semiconductor Field-Effect-Transistor*) an den KcsA-Ionenkanal aus *S. lividans* und bestimmten den Stromfluss, der durch den Kanal floss.^[196] Als weitere Anwendung dieser Kombination aus elektronischen Bauelementen und biologischen Makromolekülen nennen die Autoren, neue Einsichten in die Dynamik der Ionenleitfähigkeit sowie das Zusammenspiel zwischen Struktur und Funktion der Proteine zu gewinnen.

5.7. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Grundlagen zur Erzeugung synthetisch modifizierter Porin auf Basis des trimeren Porins OmpF erarbeitet. Als funktionelle Gruppe wurde ein Alkin in die Pore eingeführt, an dem mittels [3+2]-Click-Chemie Modulatoren angeknüpft wurden. Die hier verwendete Azid-Verbindung **13** ist als Beispielverbindung anzusehen, um die Methodik zu etablieren. Der in die Pore inkorporierte Azid-Kronenether **17** wurde aufgrund der Eigenschaft, K^+ -Ionen komplexieren zu können, als ein Modellselektivitätsfilter ausgewählt, zeigte aber keine veränderte Selektivität von z. B. Cs^+ gegenüber K^+ . Daher ist die Anknüpfung weiterer Kronenether-Moleküle, die über einen unterschiedlichen Durchmesser verfügen, sicherlich eine interessante Aufgabenstellung. Als Schlüsselschritt ist jedoch eine 2-Punkt-Fixierung anzusehen, da der Selektivitätsfilter wahrscheinlich an die Porenwand gedrückt wird und somit verschiedene Konformationen einnehmen könnte. Dies wurde ebenfalls anhand der elektrophysiologischen Einzelkanalmessungen vermutet, da diese Ergebnisse eine starke Heterogenität andeuten. Um diese flexible Modulator-Konformation in eine fixierte umzuwandeln, und um zusätzlich nur einen Durchtrittsweg für Ionen durch den Selektivitätsfilter zu gewährleisten, ist die 2-Punkt-Anknüpfung unvermeidbar. Hierzu stehen verschiedene Möglichkeiten bereit: zum einen können symmetrische Bis(thiol)-Verbindungen an Cystein-Doppelmutanten angebracht werden, die schließlich unter oxidativen Bedingungen über eine Disulfidbrücke verknüpft werden. Zum anderen können Bis(iodacetamid)-Verbindungen an die Cysteindoppelmutanten eingefügt werden, deren Länge leicht über Ethylenglykoleinheiten variiert werden kann (**Abb. 5.16**). Für die Anknüpfung asymmetrischer Modulatoren kann die NCL-Strategie verwendet werden: verfügt der Modulator über eine Iodacetamid- und eine Azidgruppe, kann es an die per SPPS eingeführte Alkinfunktion „geklickt“ werden und andererseits durch ein in die Pore eingeführtes Cystein via S-Alkylierung verknüpft werden. Neben der kovalenten Anknüpfung synthetischer Modulatoren könnte ebenfalls eine über π -stacking vermittelte nicht-kovalente Interaktion

zwischen π -Systemen, die sich innerhalb der Pore bzw. am Modulator befinden, vermittelt werden.



Ein weiteres interessantes Ziel stellt die Einführung von Photoschaltern in OmpF dar, wie es bereits an α -Hämolysin oder dem K^+ -Kanal aus der *Shaker*-Familie (Kapitel 1.2.1) gezeigt wurde. Der bereits im Rahmen einer Kollaboration mit Prof. Rück-Braun (TU Berlin) synthetisierte Photoschalter (**Abb. 5.17**) kann in die Pore via S-Alkylierung eingeführt werden, alternativ kann der Photoschalter nach Azid-Funktionalisierung durch [3+2]-Click-Chemie angeknüpft werden. Durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 406 und 480 nm kann zwischen der *E*- bzw. *Z*-Konformation hin und her geschaltet werden, sodass der Stromfluss durch die Pore moduliert werden kann.

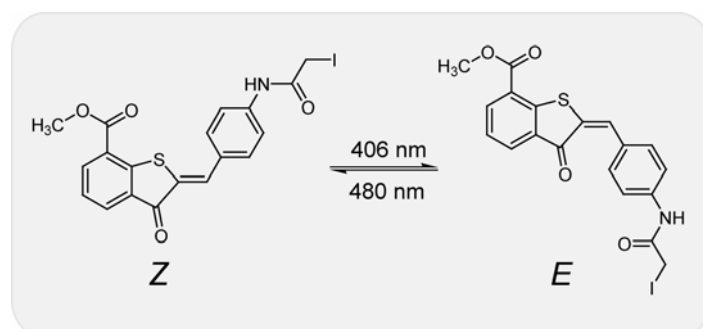


Abbildung 5.17: Synthetisierter Photoschalter (*Z/E*)-methyl2-(4-(2-iodoacetamido)benzyliden)-3-oxo-2,3-dihydrobenzo-*[b]*thiophen-7-carboxylat, der via S-Alkylierung in die Pore eingeführt wird. Photoschalter für eine 2-Punkt-Anknüpfung sind ebenfalls über ein Bis(iodacetamid) zugänglich.

Das Nachverfolgen einer Reaktion *in situ* mithilfe der Einzelkanalmessung wäre ebenfalls eine spannende Anwendung, um die Bildung von kovalenten Bindungen auf molekularer Ebene zu verfolgen.^[95] So könnten in die künstliche Lipidschicht eingebaute OmpF-Poren, die über z. B. eine Alkin-Funktion verfügen, während einer Messung mit einem dazugegeben Azidhaltigem Molekül reagieren. Auch könnten in die Pore eingeführte oder dort *in situ* erzeugte künstliche Katalysatoren (z. B. Metallkomplexe oder reaktive Kohlenstoffe) eingesetzt werden, um den Reaktionsverlauf im „Nanoreaktor“ anhand der Leitfähigkeitsmessung „live“ verfolgen zu können.

Abschließend lässt sich sagen, dass die in der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien vorkommenden β -Fass-artigen Porine eine viel versprechende Proteinklasse darstellen, um modifizierte Ionenkanäle zu erzeugen. Die im vorangestellten Kapitel genannten Anwendungen sind erste Schritte, um biologische Makromoleküle als Biosensoren zu etablieren, jedoch bedarf es weiterer Entwicklung und Optimierung, bis modulierbare Ionenkanäle eine routinemäßige Anwendung in der modernen Analytik finden.

6 Literatur

- [1] **M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker** (2001). Brock - Mikrobiologie, Spektrum Akademischer Verlag.
- [2] **J. C. Skou** (1998). The identification of the sodium-potassium pump (Nobel lecture), *Angewandte Chemie-International Edition*, **37**, 2321-2328.
- [3] **R. MacKinnon** (2004). Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction (Nobel lecture), *Angewandte Chemie-International Edition*, **43**, 4265-4277.
- [4] **P. Agre** (2004). Aquaporin water channels (Nobel lecture), *Angewandte Chemie-International Edition*, **43**, 4278-4290.
- [5] **R. M. Garavito, J. P. Rosenbusch** (1980). 3-Dimensional Crystals of an Integral Membrane-Protein - an Initial X-Ray-Analysis, *Journal of Cell Biology*, **86**, 327-329.
- [6] **T. Schirmer, T. A. Keller, Y. F. Wang, J. P. Rosenbusch** (1995). Structural Basis for Sugar Translocation through Malto porin Channels at 3.1-Angstrom Resolution, *Science*, **267**, 512-514.
- [7] **J. E. W. Meyer, M. Hofnung, G. E. Schulz** (1997). Structure of malto porin from *Salmonella typhimurium* ligated with a nitrophenyl-maltotrioxide, *Journal of Molecular Biology*, **266**, 761-775.
- [8] **D. Forst, W. Welte, T. Wacker, K. Diederichs** (1998). Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose, *Nature Structural Biology*, **5**, 37-46.
- [9] **R. Olson, H. Nariya, K. Yokota, Y. Kamio, E. Gouaux** (1999). Crystal structure of staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel, *Nature Structural Biology*, **6**, 134-140.
- [10] **K. P. Locher, B. Rees, R. Koebnik, A. Mitschler, L. Moulinier, J. P. Rosenbusch, D. Moras** (1998). Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: Crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes, *Cell*, **95**, 771-778.
- [11] **A. Pautsch, G. E. Schulz** (1998). Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain, *Nature Structural Biology*, **5**, 1013-1017.
- [12] **A. Basle, G. Rummel, P. Storici, J. P. Rosenbusch, T. Schirmer** (2006). Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 angstrom, *Journal of Molecular Biology*, **362**, 933-942.
- [13] **M. S. Weiss, G. E. Schulz** (1992). Structure of Porin Refined at 1.8 Angstrom Resolution, *Journal of Molecular Biology*, **227**, 493-509.
- [14] **V. Koronakis, A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, C. Hughes** (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export, *Nature*, **405**, 914-919.
- [15] **D. P. Chimento, A. K. Mohanty, R. J. Kadner, M. C. Wiener** (2003). Substrate-induced transmembrane signaling in the cobalamin transporter BtuB, *Nature Structural Biology*, **10**, 394-401.
- [16] **J. Vogt, G. E. Schulz** (1999). The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence, *Structure with Folding and Design*, **7**, 1301-1309.
- [17] **A. Pautsch, G. E. Schulz** (2000). High-resolution structure of the OmpA membrane domain, *Journal of Molecular Biology*, **298**, 273-282.
- [18] **M. P. Bos, V. Robert, J. Tommassen** (2007). Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane, *Annual Review of Microbiology*, **61**, 191-214.

- [19] **J. de Keyzer, C. van der Does, A. J. M. Driessen** (2003). The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **60**, 2034-2052.
- [20] **P. A. Lee, D. Tullman-Ercek, G. Georgiou** (2006). The bacterial twin-arginine translocation pathway, *Annual Review of Microbiology*, **60**, 373-395.
- [21] **E. F. Eppens, N. Nouwen, J. Tommassen** (1997). Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm, *EMBO Journal*, **16**, 4295-4301.
- [22] **N. Harms, G. Koningstein, W. Dontje, M. Muller, B. Oudega, J. Luirink, H. de Cock** (2001). The early interaction of the outer membrane protein PhoE with the periplasmic chaperone Skp occurs at the cytoplasmic membrane, *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 18804-18811.
- [23] **G. Hennecke, J. Nolte, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, S. Behrens** (2005). The periplasmic chaperone SurA exploits two features characteristic of integral outer membrane proteins for selective substrate recognition, *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 23540-23548.
- [24] **C. Spiess, A. Beil, M. Ehrmann** (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein, *Cell*, **97**, 339-347.
- [25] **A. E. Rizzitello, J. R. Harper, T. J. Silhavy** (2001). Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, **183**, 6794-6800.
- [26] **R. Voulhoux, M. P. Bos, J. Geurtsen, M. Mols, J. Tommassen** (2003). Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly, *Science*, **299**, 262-265.
- [27] **T. Wu, J. Malinverni, N. Ruiz, S. Kim, T. J. Silhavy, D. Kahne** (2005). Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*, *Cell*, **121**, 235-245.
- [28] **R. Voulhoux, J. Tommassen** (2004). Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly, *Research in Microbiology*, **155**, 129-135.
- [29] **F. Stenberg, P. Chovanec, S. L. Maslen, C. V. Robinson, L. L. Ilag, G. von Heijne, D. O. Daley** (2005). Protein complexes of the *Escherichia coli* cell envelope, *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 34409-34419.
- [30] **J. F. Stegmeier, C. Andersen** (2006). Characterization of pores formed by YaeT (Omp85) from *Escherichia coli*, *Journal of Biochemistry*, **140**, 275-283.
- [31] **V. Robert, E. B. Volokhina, F. Senf, M. P. Bos, P. Van Gelder, J. Tommassen** (2006). Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif, *Plos Biology*, **4**, 1984-1995.
- [32] **L. Sanchez-Pulido, D. Devos, S. Genevrois, M. Vicente, A. Valencia** (2003). POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins, *Trends in Biochemical Sciences*, **28**, 523-526.
- [33] **M. Struyve, M. Moons, J. Tommassen** (1991). Carboxy-Terminal Phenylalanine Is Essential for the Correct Assembly of a Bacterial Outer-Membrane Protein, *Journal of Molecular Biology*, **218**, 141-148.
- [34] **M. Klose, H. Schwarz, S. Macintyre, R. Freudl, M. L. Eschbach, U. Henning** (1988). Internal Deletions in the Gene for an *Escherichia coli* Outer-Membrane Protein Define an Area Possibly Important for Recognition of the Outer-Membrane by This Polypeptide, *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 13291-13296.
- [35] **H. deCock, J. Tommassen** (1996). Lipopolysaccharides and divalent cations are involved in the formation of an assembly-competent intermediate of outer-membrane protein PhoE of , *EMBO Journal*, **15**, 5567-5573.

- [36] **T. A. Walton, M. C. Sousa** (2004). Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation, *Molecular Cell*, **15**, 367-374.
- [37] **L. Steeghs, H. de Cock, E. Evers, B. Zomer, J. Tommassen, P. van der Ley** (2001). Outer membrane composition of a lipopolysaccharide-deficient *Neisseria meningitidis* mutant, *EMBO Journal*, **20**, 6937-6945.
- [38] **W. Vanalphen, B. Lugtenberg** (1977). Influence of Osmolarity of Growth Medium on Outer Membrane-Protein Pattern of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, **131**, 623-630.
- [39] **H. Nikaido, M. Vaara** (1985). Molecular-Basis of Bacterial Outer-Membrane Permeability, *Microbiological Reviews*, **49**, 1-32.
- [40] **C. G. Head, A. Tardy, L. J. Kenney** (1998). Relative binding affinities of OmpR and OmpR-phosphate at the *ompF* and *ompC* regulatory sites, *Journal of Molecular Biology*, **281**, 857-870.
- [41] **D. Walthers, A. Go, L. J. Kenney** (2004) in *Bacterial and Eukaryotic Porins* (Ed.: R. Benz), Wiley-VCH, pp. 1-24.
- [42] **L. A. Pratt, W. H. Hsing, K. E. Gibson, T. J. Silhavy** (1996). From acids to *osmZ*: Multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, **20**, 911-917.
- [43] **R. E. Hancock** (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier, *Trends in Microbiology*, **5**, 37-42.
- [44] **H. Nikaido** (1994). Prevention of Drug Access to Bacterial Targets - Permeability Barriers and Active Efflux, *Science*, **264**, 382-388.
- [45] **H. Nikaido, S. Normark** (1987). Sensitivity of *Escherichia coli* to Various Beta-Lactams Is Determined by the Interplay of Outer-Membrane Permeability and Degradation by Periplasmic Beta-Lactamases - a Quantitative Predictive Treatment, *Molecular Microbiology*, **1**, 29-36.
- [46] **A. D. Ferguson, E. Hofmann, J. W. Coulton, K. Diederichs, W. Welte** (1998). Siderophore-mediated iron transport: Crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide, *Science*, **282**, 2215-2220.
- [47] **S. K. Buchanan, B. S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm, J. Deisenhofer** (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*, *Nature Structural Biology*, **6**, 56-63.
- [48] **A. D. Ferguson, R. Chakraborty, B. S. Smith, L. Esser, D. van der Helm, J. Deisenhofer** (2002). Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA, *Science*, **295**, 1715-1719.
- [49] **O. Yildiz, K. R. Vinothkumar, P. Goswami, W. Kuhlbrandt** (2006). Structure of the monomeric outer-membrane porin OmpG in the open and closed conformation, *EMBO Journal*, **25**, 3702-3713.
- [50] **I. Sonntag, H. Schwarz, Y. Hirota, U. Henning** (1978). Cell-Envelope and Shape of *Escherichia coli* - Multiple Mutants Missing Outer Membrane Lipoprotein and Other Major Outer Membrane Proteins, *Journal of Bacteriology*, **136**, 280-285.
- [51] **R. Morona, C. Kramer, U. Henning** (1985). Bacteriophage Receptor Area of Outer-Membrane Protein Ompa of *Escherichia coli* K-12, *Journal of Bacteriology*, **164**, 539-543.
- [52] **J. N. Weiser, E. C. Gotschlich** (1991). Outer-Membrane Protein-a (Ompa) Contributes to Serum Resistance and Pathogenicity of *Escherichia coli* K-1, *Infection and Immunity*, **59**, 2252-2258.

- [53] **N. V. Prasadaraao, C. A. Wass, J. N. Weiser, M. F. Stins, S. H. Huang, K. S. Kim** (1996). Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells, *Infection and Immunity*, **64**, 146-153.
- [54] **K. Sugimura, T. Nishihara** (1988). Purification, Characterization, and Primary Structure of *Escherichia coli* Protease-Vii with Specificity for Paired Basic Residues - Identity of Protease-Vii and OmpT, *Journal of Bacteriology*, **170**, 5625-5632.
- [55] **G. Q. Yu, J. S. Hong** (1986). Identification and Nucleotide-Sequence of the Activator Gene of the Externally Induced Phosphoglycerate Transport-System of *Salmonella Typhimurium*, *Gene*, **45**, 51-57.
- [56] **C. Egile, H. dHauteville, C. Parsot, P. J. Sansonetti** (1997). SopA, the outer membrane protease responsible for polar localization of IcsA in *Shigella flexneri*, *Molecular Microbiology*, **23**, 1063-1073.
- [57] **A. Kaufmann, Y. D. Stierhof, U. Henning** (1994). New Outer Membrane-Associated Protease of *Escherichia coli* K-12, *Journal of Bacteriology*, **176**, 359-367.
- [58] **R. M. Webb, M. D. Lundrigan** (1996). *ompT* in *Escherichia coli* correlates with severity of disease in urinary tract infections, *Medical Microbiology Letters*, **5**, 8-14.
- [59] **L. Vandeputte-Rutten, R. A. Kramer, J. Kroon, N. Dekker, M. R. Egmond, P. Gros** (2001). Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site, *EMBO Journal*, **20**, 5033-5039.
- [60] **C. B. White, Q. Chen, G. L. Kenyon, P. C. Babbitt** (1995). A Novel Activity of OmpT - Proteolysis under Extreme Denaturing Conditions, *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 12990-12994.
- [61] **G. E. Schulz** (2002). The structure of bacterial outer membrane proteins, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1565**, 308-317.
- [62] **G. E. Schulz** (2004) in *Bacterial and Eukaryotic Porins* (Ed.: R. Benz), Wiley-VCH, pp. 25-40.
- [63] **S. W. Cowan, T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R. A. Paupit, J. N. Jansonius, J. P. Rosenbusch** (1992). Crystal-Structures Explain Functional-Properties of 2 *Escherichia coli* Porins, *Nature*, **358**, 727-733.
- [64] **G. E. Schulz** (1992). Structure-Function-Relationships in the Membrane Channel Porin as Based on a 1.8 Angstrom Resolution Crystal-Structure, *Membrane Proteins: Structures, Interactions and Models*, **25**, 403-412.
- [65] **R. Benz** (2004). *Bacterial and Eukaryotic Porins*, Wiley-VCH.
- [66] **K. Hill, K. Model, M. T. Ryan, K. Dietmeier, F. Martin, R. Wagner, N. Pfanner** (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins, *Nature*, **395**, 516-521.
- [67] **N. Wiedemann, V. Kozjak, A. Chacinska, B. Schonfisch, S. Rospert, M. T. Ryan, N. Pfanner, C. Meisinger** (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane, *Nature*, **424**, 565-571.
- [68] **S. J. Schein, M. Colombini, A. Finkelstein** (1976). Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria, *Journal of Membrane Biology*, **30**, 99-120.
- [69] **N. N. Danial, S. J. Korsmeyer** (2004). Cell death: Critical control points, *Cell*, **116**, 205-219.
- [70] **S. Hiller, R. G. Garces, T. J. Malia, V. Y. Orekhov, M. Colombini, G. Wagner** (2008). Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles, *Science*, **321**, 1206-1210.
- [71] **R. Ujwal, D. Cascio, J. P. Colletier, S. Faham, J. Zhang, L. Toro, P. P. Ping, J. Abramson** (2008). The crystal structure of mouse VDAC-1 at 2.3 angstrom resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 17742-17747.

- [72] **M. Bayrhuber, T. Meins, M. Habeck, S. Becker, K. Giller, S. Villinger, C. Vonnrhein, C. Griesinger, M. Zweckstetter, K. Zeth** (2008). Structure of the human voltage-dependent anion channel, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 15370-15375.
- [73] **E. Simamura, H. Shimada, T. Hatta, K. I. Hirai** (2008). Mitochondrial voltage-dependent anion channels (VDACs) as novel pharmacological targets for anti-cancer agents, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **40**, 213-217.
- [74] **B. W. Hoogenboom, K. Suda, A. Engel, D. Fotiadis** (2007). The supramolecular assemblies of voltage-dependent anion channels in the native membrane, *Journal of Molecular Biology*, **370**, 246-255.
- [75] **R. Zalk, A. Israelson, E. S. Garty, H. Azoulay-Zohar, V. Shoshan-Barmatz** (2005). Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria, *Biochemical Journal*, **386**, 73-83.
- [76] **T. J. Malia, G. Wagner** (2007). NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-x(L), *Biochemistry*, **46**, 514-525.
- [77] **M. Forte, E. Blachly-Dyson, M. Colombini** (1996). Structure and function of the yeast outer mitochondrial membrane channel, VDAC, *Organelle Ion Channels and Transporters*, **51**, 145-154.
- [78] **H. Bayley, L. Jayasinghe** (2004). Functional engineered channels and pores (Review), *Molecular Membrane Biology*, **21**, 209-220.
- [79] **F. I. Valiyaveetil, R. MacKinnon, T. W. Muir** (2002). Semisynthesis and folding of the potassium channel KcsA, *Journal of the American Chemical Society*, **124**, 9113-9120.
- [80] **J. H. Kleinschmidt, L. K. Tamm** (2002). Secondary and tertiary structure formation of the beta-barrel membrane protein OmpA is synchronized and depends on membrane thickness, *Journal of Molecular Biology*, **324**, 319-330.
- [81] **L.-O. Essen, Koert, U.** (2008). Ion-channel engineering, *Annual Reports on the Progress of Chemistry, Section C: Physical Chemistry*, **104**, 165-188.
- [82] **N. Sakai, J. Mareda, S. Matile** (2007). Ion channels and pores, made from scratch, *Molecular Biosystems*, **3**, 658-666.
- [83] **D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. L. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon** (1998). The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity, *Science*, **280**, 69-77.
- [84] **F. I. Valiyaveetil, M. Sekedat, T. W. Muir, R. MacKinnon** (2004). Semisynthesis of a functional K⁺ channel, *Angewandte Chemie-International Edition*, **43**, 2504-2507.
- [85] **F. I. Valiyaveetil, M. Sekedat, R. MacKinnon, T. W. Muir** (2006). Structural and functional consequences of an amide-to-ester substitution in the selectivity filter of a potassium channel, *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 11591-11599.
- [86] **F. I. Valiyaveetil, M. Sekedat, R. MacKinnon, T. W. Muir** (2004). Glycine as a D-amino acid surrogate in the K⁺-selectivity filter, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 17045-17049.
- [87] **M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer** (2004). Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing, *Nature Neuroscience*, **7**, 1381-1386.
- [88] **M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, D. Trauner** (2006). Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch, *Nature Chemical Biology*, **2**, 47-52.
- [89] **L. Q. Gu, O. Braha, S. Conlan, S. Cheley, H. Bayley** (1999). Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter, *Nature*, **398**, 686-690.

- [90] **Y. Astier, O. Braha, H. Bayley** (2006). Toward single molecule DNA sequencing: Direct identification of ribonucleoside and deoxyribonucleoside 5'-monophosphates by using an engineered protein nanopore equipped with a molecular adapter, *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 1705-1710.
- [91] **H. Bayley, P. S. Cremer** (2001). Stochastic sensors inspired by biology, *Nature*, **413**, 226-230.
- [92] **X. F. Kang, S. Cheley, X. Y. Guan, H. Bayley** (2006). Stochastic detection of enantiomers, *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 10684-10685.
- [93] **X. Y. Guan, L. Q. Gu, S. Cheley, O. Braha, H. Bayley** (2005). Stochastic sensing of TNT with a genetically engineered pore, *Chembiochem*, **6**, 1875-1881.
- [94] **S. Loudwig, H. Bayley** (2006). Photoisomerization of an individual azobenzene molecule in water: An on-off switch triggered by light at a fixed wavelength, *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 12404-12405.
- [95] **S. H. Shin, M. B. Steffensen, T. D. W. Claridge, H. Bayley** (2007). Formation of a chiral center and pyrimidal inversion at the single-molecule level, *Angewandte Chemie-International Edition*, **46**, 7412-7416.
- [96] **G. Chang, R. H. Spencer, A. T. Lee, M. T. Barclay, D. C. Rees** (1998). Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: A gated mechanosensitive ion channel, *Science*, **282**, 2220-2226.
- [97] **A. Kocer, M. Walko, W. Meijberg, B. L. Feringa** (2005). A light-actuated nanovalve derived from a channel protein, *Science*, **309**, 755-758.
- [98] **A. Kocer, M. Walko, E. Bulten, E. Halza, B. L. Feringa, W. Meijberg** (2006). Rationally designed chemical modulators convert a bacterial channel protein into a pH-sensory valve, *Angewandte Chemie-International Edition*, **45**, 3126-3130.
- [99] **R. R. Ketchum, K. C. Lee, S. Huo, T. A. Cross** (1996). Macromolecular structural elucidation with solid-state NMR-derived orientational constraints, *Journal of Biomolecular Nmr*, **8**, 1-14.
- [100] **H. D. Arndt, A. Knoll, U. Koert** (2001). Cyclohexylether delta-amino acids: New leads for selectivity filters in ion channels, *Angewandte Chemie-International Edition*, **40**, 2076-2078.
- [101] **J. R. Pfeifer, P. Reiss, U. Koert** (2006). Crown ether-gramicidin hybrid ion channels: Dehydration-assisted ion selectivity, *Angewandte Chemie-International Edition*, **45**, 501-504.
- [102] **R. Wesolowski, A. Sommer, H. D. Arndt, U. Koert, P. Reiss, S. Wimmers, O. Strauss** (2007). Functional studies of synthetic gramicidin hybrid ion channels in CHO cells, *Chembiochem*, **8**, 513-520.
- [103] **L. Al-Momani, P. Reiss, U. Koert** (2005). A lipid dependence in the formation of twin ion channels, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **328**, 342-347.
- [104] **S. Schroder, A. K. Schrey, A. Knoll, P. Reiss, B. Ziemer, U. Koert** (2006). Tetrahydropyran-amino acids: Novel building blocks for gramicidin-hybrid ion channels, *European Journal of Organic Chemistry*, 2766-2776.
- [105] **N. Sakai, J. Mareda, S. Matile** (2005). Rigid-rod molecules in biomembrane models: From hydrogen-bonded chains to synthetic multifunctional pores, *Accounts of Chemical Research*, **38**, 79-87.
- [106] **N. Sakai, D. Gerard, S. Matile** (2001). Electrostatics of cell membrane recognition: Structure and activity of neutral and cationic rigid push-pull rods in isoelectric, anionic, and polarized lipid bilayer membranes, *Journal of the American Chemical Society*, **123**, 2517-2524.

- [107] **J. Y. Winum, S. Matile** (1999). Rigid push-pull oligo(p-phenylene) rods: Depolarization of bilayer membranes with negative membrane potential, *Journal of the American Chemical Society*, **121**, 7961-7962.
- [108] **V. Gorteau, G. Bollot, J. Mareda, A. Perez-Velasco, S. Matile** (2006). Rigid oligonaphthalenediimide rods as transmembrane anion-pi slides, *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 14788-14789.
- [109] **M. M. Tedesco, B. Ghebremariam, N. Sakai, S. Matile** (1999). Modeling the selectivity of potassium channels with synthetic, ligand-assembled pi slides, *Angewandte Chemie-International Edition*, **38**, 540-543.
- [110] **M. E. Weber, P. H. Schlesinger, G. W. Gokel** (2005). Dynamic assessment of bilayer thickness by varying phospholipid and hydrophile synthetic channel chain lengths, *Journal of American Chemical Society*, **127**, 636-642.
- [111] **F. Otis, N. Voyer, A. Polidori, B. Pucci** (2006). End group engineering of artificial ion channels, *New Journal of Chemistry*, **30**, 185-190.
- [112] **N. Voyer, M. Robitaille** (1995). A Novel Functional Artificial Ion-Channel, *Journal of the American Chemical Society*, **117**, 6599-6600.
- [113] **A. Prilipov, P. S. Phale, P. Van Gelder, J. P. Rosenbusch, R. Koebnik** (1998). Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from *E. coli*, *Fems Microbiology Letters*, **163**, 65-72.
- [114] **G. Studnik** (2005) Diplomarbeit: Chemoenzymatische Synthese von Hybridmembranproteinen basierend auf dem trimeren *E. coli* Porin OmpF, Philipps-Universität Marburg
- [115] **F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5463-5467.
- [116] **W. J. Dower, J. F. Miller, C. W. Ragsdale** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Research*, **16**, 6127-6145.
- [117] **U. K. Laemmli** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- [118] **J. Bennett, K. J. Scott** (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue, *Analytical Biochemistry*, **43**, 173-182.
- [119] **R. M. Garavito, J. P. Rosenbusch** (1986). Isolation and Crystallization of Bacterial Porin, *Methods in Enzymology*, **125**, 309-328.
- [120] **T. Surrey, F. Jahnig** (1992). Refolding and oriented insertion of a membrane protein into a lipid bilayer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 7457-7461.
- [121] **T. Surrey, A. Schmid, F. Jahnig** (1996). Folding and membrane insertion of the trimeric beta-barrel protein OmpF, *Biochemistry*, **35**, 2283-2288.
- [122] **A. Sliwinski-Korell, H. Engelhardt, M. Kampka, F. Lutz** (1999). Oligomerization and structural changes of the pore-forming *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin, *European Journal of Biochemistry*, **265**, 221-230.
- [123] **P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry*, **150**, 76-85.
- [124] **M. R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel, D. F. Hochstrasser** (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server, *Methods in Molecular Biology*, **112**, 531-552.
- [125] **R. B. Merrifield** (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. 1. Synthesis of a Tetrapeptide, *Journal of the American Chemical Society*, **85**, 2149-2154.

- [126] **P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent** (1994). Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation, *Science*, **266**, 776-779.
- [127] **P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent** (1997). Modulation of reactivity in native chemical ligation through the use of thiol additives, *Journal of the American Chemical Society*, **119**, 4325-4329.
- [128] **C. P. R. Hackenberger, C. T. Friel, S. E. Radford, B. Imperiali** (2005). Semisynthesis of a glycosylated Im7 analogue for protein folding studies, *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 12882-12889.
- [129] **T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson** (1999). Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 10068-10073.
- [130] **E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent** (2006). Insights into the mechanism and catalysis of the native chemical ligation reaction, *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 6640-6646.
- [131] **H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless** (2001). Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions, *Angewandte Chemie-International Edition*, **40**, 2004-2021.
- [132] **R. Huisgen** (1984). 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, *Vol. 1*, Wiley, New York.
- [133] **V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless** (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes, *Angewandte Chemie-International Edition*, **41**, 2596-2599.
- [134] **A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt** (2003). Activity-based protein profiling in vivo using a copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition, *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 4686-4687.
- [135] **S. I. van Kasteren, H. B. Kramer, H. H. Jensen, S. J. Campbell, J. Kirkpatrick, N. J. Oldham, D. C. Anthony, B. G. Davis** (2007). Expanding the diversity of chemical protein modification allows post-translational mimicry, *Nature*, **446**, 1105-1109.
- [136] **J. E. Moses, A. D. Moorhouse** (2007). The growing applications of click chemistry, *Chemical Society Reviews*, **36**, 1249-1262.
- [137] **L. J. Macpherson, A. E. Dubin, M. J. Evans, F. Marr, P. G. Schultz, B. F. Cravatt, A. Patapoutian** (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines, *Nature*, **445**, 541-545.
- [138] **S. M. Kelly, N. C. Price** (2000). The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function, *Curr Protein Pept Sci*, **1**, 349-384.
- [139] **N. J. Greenfield** (1996). Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data, *Analytical Biochemistry*, **235**, 1-10.
- [140] **J. Jancarik, S. H. Kim** (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins, *Journal of Applied Crystallography*, **24**, 409-411.
- [141] **W. Kabsch** (2008). The XDS Programm Package.
- [142] **CCP4** (1994). The CCP4 suite: Programs for protein crystallography, *Acta Crystallographica Section D*, **50**, 760-763.
- [143] **P. Emsley, K. Cowtan** (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallographica Section D*, **60**, 2126-2132.
- [144] **G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson** (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallographica Section D*, **53**, 240-255.
- [145] **W. L. Delano** (2002). The PyMOL Molecular Graphics System.
- [146] **M. Cebi** (2008) Dissertation: Synthese und Modifikation von Hybridionenkanälen, Philipps-Universität Marburg

- [147] **G. L. Ellman** (1959). Tissue Sulphydryl Groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **82**, 70-77.
- [148] **J. L. Eisele, J. P. Rosenbusch** (1990). Invitro Folding and Oligomerization of a Membrane-Protein - Transition of Bacterial Porin from Random Coil to Native Conformation, *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 10217-10220.
- [149] **A. Alcaraz, E. M. Nestorovich, M. Aguilera-Arzo, V. M. Aguilera, S. M. Bezrukov** (2004). Salting out the ionic selectivity of a wide channel: The asymmetry of OmpF, *Biophysical Journal*, **87**, 943-957.
- [150] **A. Basle, R. Iyer, A. H. Delcour** (2004). Subconductance states in OmpF gating, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1664**, 100-107.
- [151] **E. M. Nestorovich, T. K. Rostovtseva, S. M. Bezrukov** (2003). Residue ionization and ion transport through OmpF channels, *Biophysical Journal*, **85**, 3718-3729.
- [152] **R. A. Pauptit, H. Zhang, G. Rummel, T. Schirmer, J. N. Jansonius, J. P. Rosenbusch** (1991). Trigonal Crystals of Porin from *Escherichia coli*, *Journal of Molecular Biology*, **218**, 505-507.
- [153] **S. W. Cowan, R. M. Garavito, J. N. Jansonius, J. A. Jenkins, R. Karlsson, N. Konig, E. F. Pai, R. A. Pauptit, P. J. Rizkallah, J. P. Rosenbusch, G. Rummel, T. Schirmer** (1995). The Structure of OmpF Porin in a Tetragonal Crystal Form, *Structure*, **3**, 1041-1050.
- [154] **H. M. Ratajczak, T. Lis, G. Rusek** (1994). The Crystal and Molecular-Structure of (Dibenzo-18-Crown-6) Oxonium Tetrachloroferrate(iii), *Journal of Molecular Structure*, **327**, 241-246.
- [155] **K. F. Mok, V. McKee, W. T. Robinson** (1989). Structure of a Dipotassium Tetrathiocyanatomercurate(ii) Salt with Dibenzo-18-Crown-6, *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications*, **45**, 201-204.
- [156] **J. W. Steed** (2001). First- and second-sphere coordination chemistry of alkali metal crown ether complexes, *Coordination Chemistry Reviews*, **215**, 171-221.
- [157] **A. V. Bajaj, N. S. Poonia** (1988). Comprehensive Coordination Chemistry of Alkali and Alkaline-Earth Cations with Macrocyclic Multidentates - Latest Position, *Coordination Chemistry Reviews*, **87**, 55-213.
- [158] **S. B. H. Kent** (2009). Total chemical synthesis of proteins, *Chemical Society Reviews*, **38**, 338-351.
- [159] **E. Yamashita, M. V. Zhelnina, S. D. Zakharov, O. Sharma, W. A. Cramer** (2008). Crystal structures of the OmpF porin: function in a colicin translocon, *EMBO Journal*, **27**, 2171-2180.
- [160] **A. Baslé, Delcour, A. H.** (2004) in *Bacterial and Eukaryotic Porins* (Ed.: R. Benz), Wiley-VCH, pp. 79-98.
- [161] **N. Saint, A. Prilipov, A. Hardmeyer, K. L. Lou, T. Schirmer, J. P. Rosenbusch** (1996). Replacement of the sole histidyl residue in OmpF porin from *E. coli* by threonine (H21T) does not affect channel structure and function, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **223**, 118-122.
- [162] **P. S. Phale, T. Schirmer, A. Prilipov, K. L. Lou, A. Hardmeyer, J. P. Rosenbusch** (1997). Voltage gating of *Escherichia coli* porin channels: Role of the constriction loop, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 6741-6745.
- [163] **G. Bainbridge, H. Mobasher, G. A. Armstrong, E. J. A. Lea, J. H. Lakey** (1998). Voltage-gating of *Escherichia coli* porin: A cysteine-scanning mutagenesis study of loop 3, *Journal of Molecular Biology*, **275**, 171-176.
- [164] **P. S. Phale, A. Philippsen, C. Widmer, V. P. Phale, J. P. Rosenbusch, T. Schirmer** (2001). Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction probed by mutagenesis and simulation, *Biochemistry*, **40**, 6319-6325.

- [165] **J. Bredin, N. Saint, M. Mallea, E. De, G. Molle, J. M. Pages, V. Simonet** (2002). Alteration of pore properties of *Escherichia coli* OmpF induced by mutation of key residues in anti-loop 3 region, *Biochemical Journal*, **363**, 521-528.
- [166] **P. VanGelder, N. Saint, P. Phale, E. F. Eppens, A. Prilipov, R. vanBoxtel, J. P. Rosenbusch, J. Tommassen** (1997). Voltage sensing in the PhoE and OmpF outer membrane porins of *Escherichia coli*: Role of charged residues, *Journal of Molecular Biology*, **269**, 468-472.
- [167] **D. J. Muller, A. Engel** (1999). Voltage and pH-induced channel closure of porin OmpF visualized by atomic force microscopy, *Journal of Molecular Biology*, **285**, 1347-1351.
- [168] **G. Bainbridge, I. Gokce, J. H. Lakey** (1998). Voltage gating is a fundamental feature of porin and toxin beta-barrel membrane channels, *Febs Letters*, **431**, 305-308.
- [169] **E. M. Nestorovich, T. K. Rostovtseva, S. M. Bezrukov** (2002). Residue protonation, transport properties, and structural stability of OmpF channels, *Biophysical Journal*, **82**, 915-922.
- [170] **T. K. Rostovtseva, E. M. Nestorovich, S. M. Bezrukov** (2002). Partitioning of differently sized poly(ethylene glycol)s into OmpF porin, *Biophysical Journal*, **82**, 160-169.
- [171] **C. Danelon, E. M. Nestorovich, M. Winterhalter, S. M. Bezrukov** (2003). Interaction of antibiotics with the OmpF channel: effect on translocation, *Biophysical Journal*, **84**, 534-540.
- [172] **H. Morgan, J. T. Lonsdale, G. Alder** (1990). Polarity-Dependent Voltage-Gated Porin Channels from *Escherichia coli* in Lipid Bilayer-Membranes, *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1021**, 175-181.
- [173] **S. Conlan, Y. Zhang, S. Cheley, H. Bayley** (2000). Biochemical and biophysical characterization of OmpG: A monomeric porin, *Biochemistry*, **39**, 11845-11854.
- [174] **S. Howorka, J. Nam, H. Bayley, D. Kahne** (2004). Stochastic detection of monovalent and bivalent protein-ligand interactions, *Angewandte Chemie-International Edition*, **43**, 842-846.
- [175] **P. M. Kane, C. T. Yamashiro, D. F. Wolczyk, N. Neff, M. Goebel, T. H. Stevens** (1990). Protein Splicing Converts the Yeast Tfp1 Gene-Product to the 69-kDa Subunit of the Vacuolar H⁺-Adenosine Triphosphatase, *Science*, **250**, 651-657.
- [176] **R. Hirata, A. Nakano, H. Kawasaki, K. Suzuki, Y. Anraku** (1990). Molecular-Structure of a Gene, Vma1, Encoding the Catalytic Subunit of H⁺-Translocating Adenosine-Triphosphatase from Vacuolar Membranes of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 6726-6733.
- [177] **H. Paulus** (2000). Protein splicing and related forms of protein autoprocessing, *Annual Review of Biochemistry*, **69**, 447-496.
- [178] **S. Brenzel, M. Cebi, P. Reiss, U. Koert, H. D. Mootz** (2009). Expanding the scope of protein trans-splicing to fragment ligation of an integral membrane protein: towards modulation of porin-based ion channels by chemical modification, *Chembiochem*, **10**, 983-986.
- [179] **W. Luebben** (2007) Diplomarbeit: Chemoenzymatische Synthese von Hybridmembranproteinen basierend auf dem monomeren *E. coli* Porin OmpG, Philipps-Universität Marburg
- [180] **H. W. Große** (2008) Diplomarbeit: Biohybride auf Basis des monomeren OmpG, Philipps-Universität Marburg
- [181] **G. V. Subbarao, B. van den Berg** (2006). Crystal structure of the monomeric porin OmpG, *Journal of Molecular Biology*, **360**, 750-759.
- [182] **A. Kocer** (2007). A remote controlled valve in Liposomes for triggered liposomal release, *Journal of Liposome Research*, **17**, 219-225.

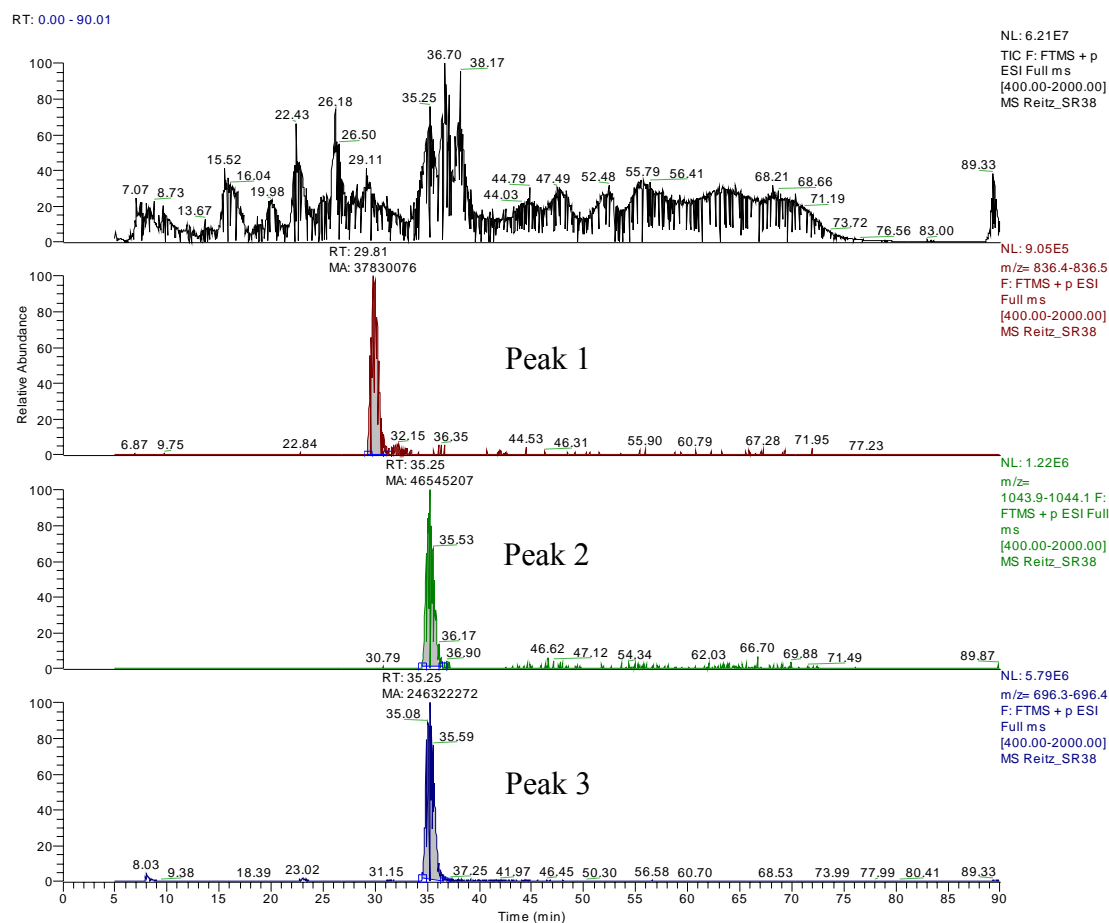
- [183] **G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Mustl, E. Bamberg, P. Hegemann** (2002). Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae, *Science*, **296**, 2395-2398.
- [184] **G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, E. Bamberg** (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 13940-13945.
- [185] **D. Huber, L. Petreanu, N. Ghitani, S. Ranade, T. Hromadka, Z. Mainen, K. Svoboda** (2008). Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice, *Nature*, **451**, 61-67.
- [186] **A. D. Douglass, S. Kraves, K. Deisseroth, A. F. Schier, F. Engert** (2008). Escape behavior elicited by single, Channelrhodopsin-2-evoked spikes in zebrafish somatosensory neurons, *Current Biology*, **18**, 1133-1137.
- [187] **P. S. Lagali, D. Balya, G. B. Awatramani, T. A. Munch, D. S. Kim, V. Busskamp, C. L. Cepko, B. Roska** (2008). Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration, *Nature Neuroscience*, **11**, 667-675.
- [188] **H. M. Ellerby, S. Lee, L. M. Ellerby, S. Chen, T. Kiyota, G. del Rio, G. Sugihara, Y. Sun, D. E. Bredesen, W. Arap, R. Pasqualini** (2003). An artificially designed pore-forming protein with anti-tumor effects, *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 35311-35316.
- [189] **X. Q. Qiu, H. Wang, X. F. Lu, J. Zhang, S. F. Li, G. Cheng, L. Wan, L. Yang, J. Y. Zuo, Y. Q. Zhou, H. Y. Wang, X. Cheng, S. H. Zhang, Z. R. Ou, Z. C. Zhong, J. Q. Cheng, Y. P. Li, G. Y. Wu** (2003). An engineered multidomain bactericidal peptide as a model for targeted antibiotics against specific bacteria, *Nature Biotechnology*, **21**, 1480-1485.
- [190] **M. J. Russo, H. Bayley, M. Toner** (1997). Reversible permeabilization of plasma membranes with an engineered switchable pore, *Nature Biotechnology*, **15**, 278-282.
- [191] **S. Howorka, S. Cheley, H. Bayley** (2001). Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores, *Nature Biotechnology*, **19**, 636-639.
- [192] **S. Howorka, L. Movileanu, O. Braha, H. Bayley** (2001). Kinetics of duplex formation for individual DNA strands within a single protein nanopore, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 12996-13001.
- [193] **Y. N. Antonenko, T. I. Rokitskaya, E. A. Kotova, G. O. Reznik, T. Sano, C. R. Cantor** (2004). Effect of streptavidins with varying biotin binding affinities on the properties of biotinylated gramicidin channels, *Biochemistry*, **43**, 4575-4582.
- [194] **A. Anastasiadis, C. J. Morton, G. H. Talbo, R. E. Koeppe, F. Separovic** (2006). Effect of linker length on avidin binding to biotinylated gramicidin A, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **12**, 243-252.
- [195] **H. M. Keizer, B. R. Dorvel, M. Andersson, D. Fine, R. B. Price, J. R. Long, A. Dodabalapur, I. Koper, W. Knoll, P. A. V. Anderson, R. S. Duran** (2007). Functional ion channels in tethered bilayer membranes - Implications for biosensors, *ChemBiochem*, **8**, 1246-1250.
- [196] **C. Millar, S. Roy, A. R. Brown, A. Asenov** (2007). Simulating the bio-nanoelectronic interface, *Journal of Physics-Condensed Matter*, **19**, 1-12.

7 Anhang

7.1. Massenspektrometrische Analytik

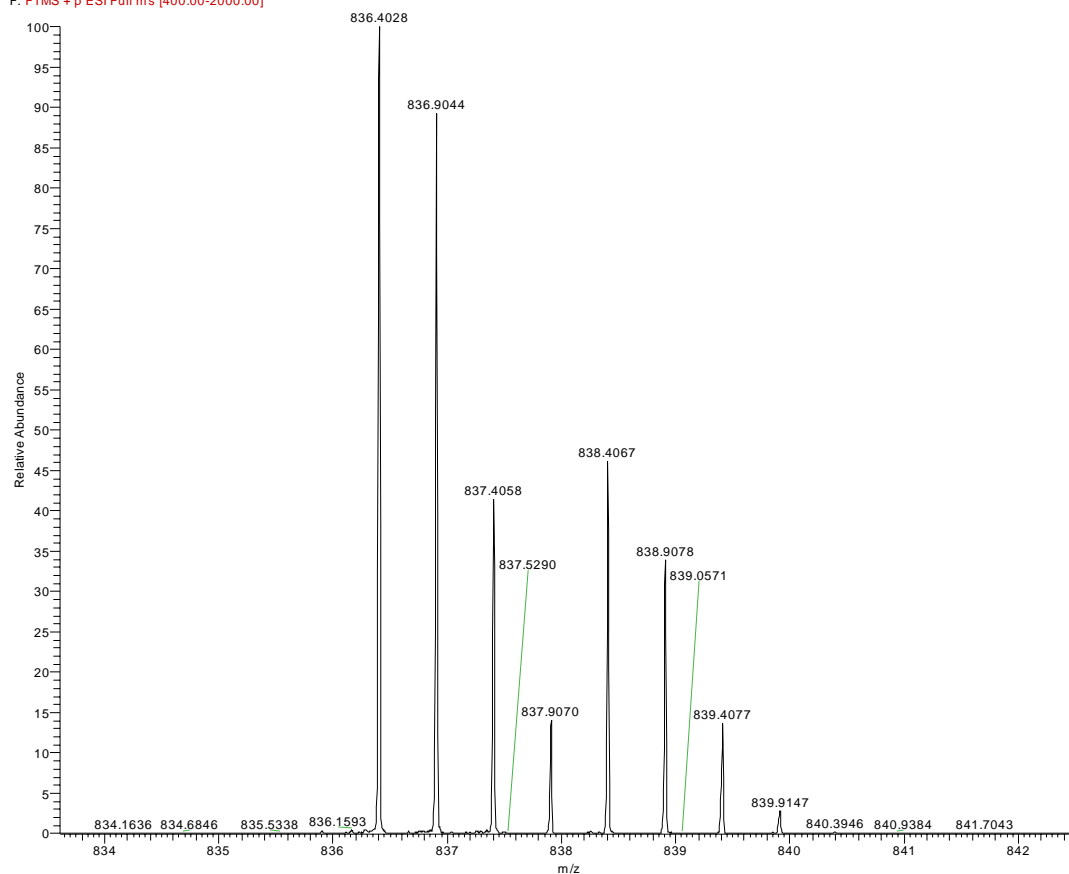
Die nachfolgend aufgeführten Peptid-Fragmente konnten aufgrund der hohen Genauigkeit der bestimmten Massen und des Fragmentierungsmusters eindeutig bestimmt werden. In **Abb. 7.1** ist das Beispiel der Messung aus Kap. 7.1.3/ Produkt **26**, gezeigt. Durch Integration der Peaks konnte das Verhältnis von Edukt:Produkt abgeschätzt werden. Es wurden keine anderen Massen mit weiteren m/z-Verhältnissen als die angegeben gefunden.

Chromatogramm der UV-Spur und der extrahierten Massen:



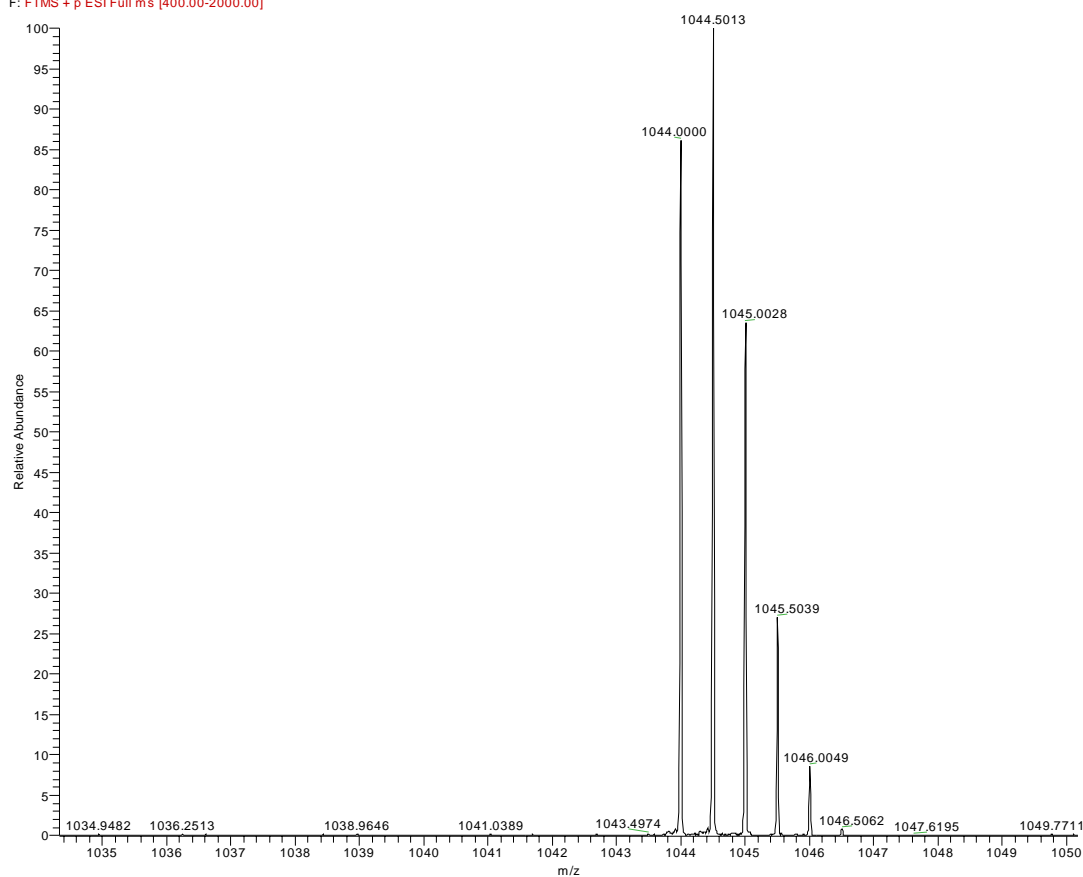
Gemessene Massen zu Peak 1, entspricht $[M+2H]^+$ des unmodifizierten Fragments:

Reitz_SR38 #3913-4191 RT: 29.11-30.62 AV: 73 NL: 3.86E5
F: FTMS + p ESI Full ms [400.00-2000.00]



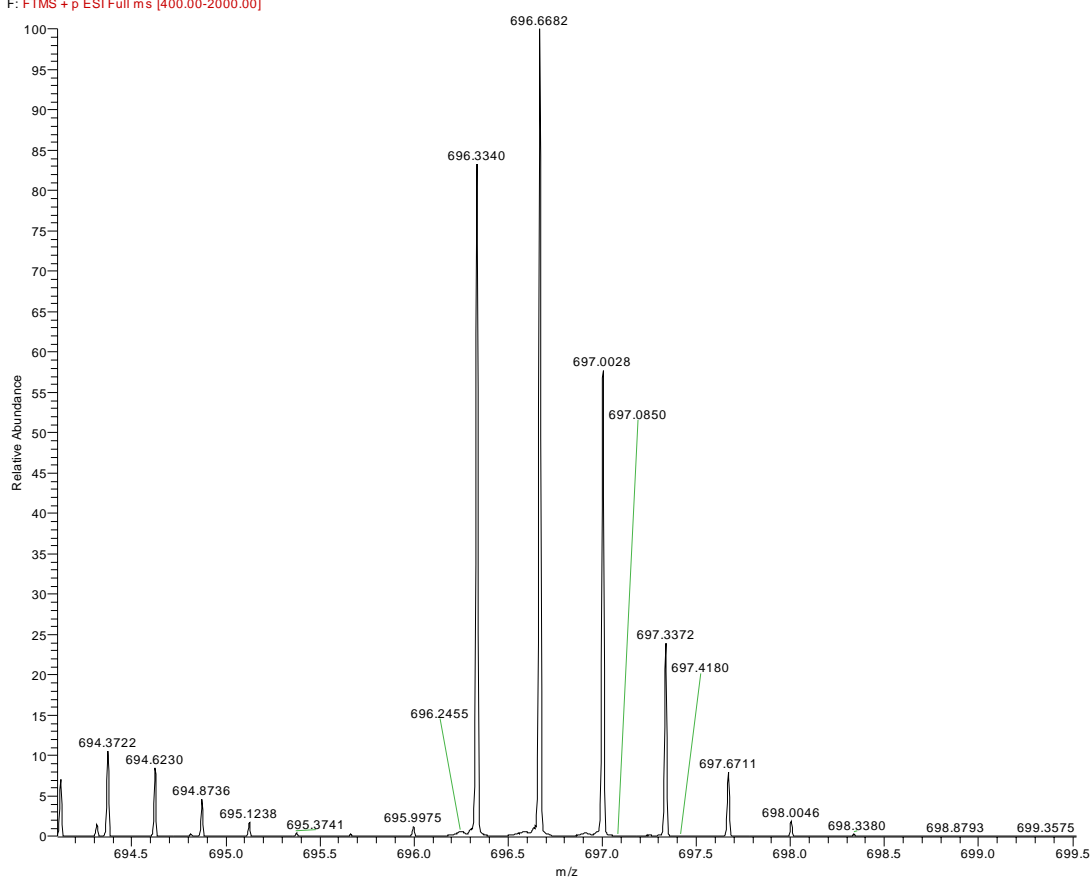
Gemessene Massen zu Peak 2, entspricht $[M+2H]^+{}^{2+}$ des modifizierten Fragments:

Reitz_SR38 #4860-5213 RT: 34.43-36.30 AV: 89 NL: 4.76E5
F: FTMS + p ESI Full ms [400.00-2000.00]



Gemessene Massen zu Peak 3, entspricht $[M+3H]^+{}^{3+}$ des modifizierten Fragments:

Reitz_SR38 #4838-5192 RT: 34.30-36.19 AV: 90 NL: 2.50E6
F: FTMS + p ESI Full ms [400.00-2000.00]



7.1.1. Analytik der NCL

Die Analyse der tryptischen Fragmente des OmpF-Hybrids, erzeugt durch NCL, ergab eine Vielzahl von Fragmenten. Das entsprechende Fragment, das die Ligationstelle Gly26-Cys27 enthält, konnte nicht detektiert werden, möglicherweise durch chemische Modifikation wie Desamidierung von Rest Asn30/35 oder Oxidation von Met38.

Probe	AA-Sequenz des entspr. Fragments	Art der Modifikation	Berechnete Masse	gemessene monoisotopische Masse	Umsatz [#]
OmpF-N27C	aa 17-25: AVGLHYFSK	NCL, natives Peptid 22	$[M+H]^+{}^+ =$ 1021.547	1021.549	-
OmpF-[16Π]-N27C	aa 11-25: VDLYG ΠAVGLHYFSK	NCL, modifiziertes Peptid 23	$[M+2H]^+{}^{2+} =$ 885.449	885.449	-

7.1.2. Analytik der NCL / [3+2]-Click-Reaktion, Produkt 28

Probe	AA-Sequenz des entspr. Fragments	Art der Modifikation	Berechnete Masse	gemessene monoisotopische Masse	Umsatz [#]
OmpF-[16 II -13]-N27C	aa 11-25: VDLYG[II]AVGLH YFSK	unmodifiziert	$[M+2H^+]^{2+}$ = 885.449	885.449	90%
	aa 11-25: VDLYG[II -13]AVGLHYFSK	[3+2]-Click-Reaktion	$[M+2H^+]^{2+}$ = 1045.004	1045.005	
			$[M+3H^+]^{3+}$ = 697.005	697.005	

[#]Umsatz durch Peak-Integration bestimmt

7.1.3. Analytik der S-Alkylierungsreaktion von OmpF-K16C

→ Mit dem Dansyl-Iodacetamid **19**, Produkt **25**

Probe	AA-Sequenz des entspr. Fragments	Art der Modifikation	Berechnete Masse	gemessene monoisotopische Masse	Umsatz [#]
OmpF-Cys16- 19	aa 11-25: VDLYG[C - 19]AVGLHYFSK	S-Alkylierung	$[M+2H^+]^{2+}$ = 1002.971	1002.976	100%
			$[M+3H^+]^{3+}$ = 668.984	668.985	

[#]Unmodifizierte Fragmente wurden nicht detektiert, daher quantitativer Umsatz

→ Mit der Dibenzo-18-Krone-6 **17**, Produkt **26**

Probe	AA-Sequenz des entspr. Fragments	Art der Modifikation	Berechnete Masse	gemessene monoisotopische Masse	Umsatz [#]
OmpF-Cys16- 17	aa 11-25: VDLYG[C - 17]AVGLHYFSK	unmodifiziert	$[M+2H^+]^{2+}$ = 836.414	836.401	89%, 100%
		S-Alkylierung	$[M+2H^+]^{2+}$ = 1043.990	1043.996	
			$[M+3H^+]^{3+}$ = 696.326	696.334	

[#]In einer Probenpräparation wurden durch Peak-Integration 11% nicht-umgesetztes Edukt abgeschätzt; in einer zweiten Präparation wurde ein quantitativer Umsatz gefunden

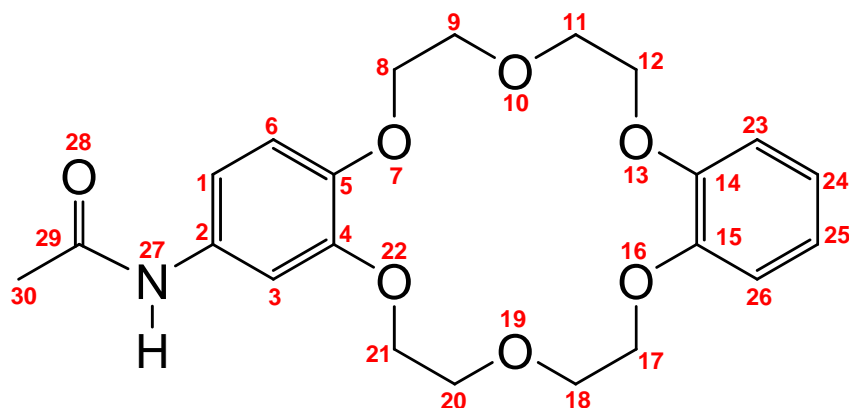
7.1.4. Analytik der Proben aus Kapitel 4.6.2, Produkte 29b und 30a-d, entsprechend der S-Alkylierung mit 18 und [3+2]-Click-Reaktion mit 13

Probe	AA-Sequenz des entspr. Fragments	Art der Modifikation	Berechnete Masse	gemessene monoisotopische Masse	Umsatz [#]
OmpF-Cys16- 18-13 → 30d	VDLYG[C- 18-13]AV GLHYFSK	[3+2]-Click-Reaktion	$[M+2H^+]^{2+}$ = 1074.495 $[M+3H^+]^{3+}$ = 716.666	1074.496 716.666	100%
OmpF-Cys181- 18-13 → 30a *	SNGDGVGGSISY[C- 18-13] YEGFGIV GAYGAADR	-	-	-	-
OmpF-Cys221- 18 → 29b	Y[C- 18]ANNIYL AANYGETR	S-Alkylierung	$[M+2H^+]^{2+}$ = 996.950 $[M+3H^+]^{3+}$ = 664.969	996.949 646.968	7.4%
OmpF-Cys221- 18-13 → 30b	Y[C- 18-13]ANNIYL AANYGETR	[3+2]-Click-Reaktion	$[M+2H^+]^{2+}$ = 1156.505 $[M+3H^+]^{3+}$ = 771.339	1156.506 771.339	92.6%
OmpF-Cys 226- 18-13 → 30c	YDANNI[C- 18-13]LAA NYGETR	[3+2]-Click-Reaktion	$[M+2H^+]^{2+}$ = 1132.487 $[M+3H^+]^{3+}$ = 755.327	1132.488 755.327	100%

[#]Umsatz durch Peak-Integration bestimmt, gänzlich unmodifizierte Fragmente wurden in keiner Messung detektiert

*Fragmente nicht in Messung detektiert

7.2. Verwendete stereochemische Parameter für die Verfeinerung der Dibenzo-18-Krone-6



Bindungsabstand / Å											
C30	C28	1.507		H212	C21	1.092		H24	C24	1.083	
H303	C30	1.059		C21	C20	1.498		H25	C25	1.083	
H302	C30	1.059		H201	C20	1.092		H26	C26	1.083	
H301	C30	1.059		H202	C20	1.092		C14	O13	1.370	
C28	O29	1.213		C20	O19	1.419		O13	C12	1.432	
N27	C28	1.348		O19	C18	1.419		H121	C12	1.092	
H27	N27	1.082		H181	C18	1.092		H122	C12	1.092	
C2	N27	1.396		H182	C18	1.092		C12	C11	1.498	
C1	C2	1.390		C18	C17	1.498		H111	C11	1.092	
C2	C3	1.390		H171	C17	1.092		H112	C11	1.092	
C6	C1	1.390		H172	C17	1.092		C11	O10	1.419	
C5	C6	1.390		C17	O16	1.432		O10	C9	1.419	
C3	C4	1.390		O16	C15	1.370		H91	C9	1.092	
C4	C5	1.390		C26	C15	1.390		H92	C9	1.092	
H1	C1	1.083		C15	C14	1.390		C9	C8	1.498	
H3	C3	1.083		C25	C26	1.390		H82	C8	1.092	
H6	C6	1.083		C24	C25	1.390		H81	C8	1.092	
C4	O22	1.370		C23	C24	1.390		C8	O7	1.432	
O22	C21	1.432		C14	C23	1.390		O7	C5	1.370	
H211	C21	1.092		H23	C23	1.083					
Bindungswinkel / °											
O29	C28	C30	119.920	O29	C28	C30	119.920	H23	C23	C14	120.000
O29	C28	N27	120.040	O29	C28	N27	120.040	C15	O16	C17	117.800
C30	C28	N27	120.040	C30	C28	N27	120.040	O16	C17	H171	109.470
C28	C30	H303	109.470	C28	C30	H303	109.470	O16	C17	H172	109.470
C28	C30	H302	109.470	C28	C30	H302	109.470	O16	C17	C18	107.200
C28	C30	H301	109.470	C28	C30	H301	109.470	H171	C17	H172	107.900
H303	C30	H302	109.470	H303	C30	H302	109.470	H171	C17	C18	109.470
H303	C30	H301	109.470	H303	C30	H301	109.470	H172	C17	C18	109.470
H302	C30	H301	109.470	H302	C30	H301	109.470	C17	C18	H181	109.470
C28	N27	H27	120.000	C28	N27	H27	120.000	C17	C18	H182	109.470
C28	N27	C2	120.000	C28	N27	C2	120.000	C17	C18	O19	108.300
H27	N27	C2	120.000	H27	N27	C2	120.000	H181	C18	H182	107.900

N27	C2	C1	120.000	N27	C2	C1	120.000	H181	C18	O19	109.470			
N27	C2	C3	120.000	N27	C2	C3	120.000	H182	C18	O19	109.470			
C1	C2	C3	120.000	C1	C2	C3	120.000	C18	O19	C20	111.800			
C2	C1	H1	120.000	C2	C1	H1	120.000	O19	C20	H201	109.470			
C2	C1	C6	120.000	C2	C1	C6	120.000	O19	C20	H202	109.470			
H1	C1	C6	120.000	H1	C1	C6	120.000	O19	C20	C21	108.300			
C1	C6	H6	120.000	C1	C6	H6	120.000	H201	C20	H202	107.900			
C1	C6	C5	120.000	C1	C6	C5	120.000	H201	C20	C21	109.470			
H6	C6	C5	120.000	H6	C6	C5	120.000	H202	C20	C21	109.470			
C6	C5	O7	125.000	C6	C5	O7	125.000	C20	C21	H212	109.470			
C6	C5	C4	120.000	C6	C5	C4	120.000	C20	C21	H211	109.470			
O7	C5	C4	115.000	O7	C5	C4	115.000	C20	C21	O22	107.200			
C5	O7	C8	117.800	C5	O7	C8	117.800	H212	C21	H211	107.900			
O7	C8	H82	109.470	O7	C8	H82	109.470	H212	C21	O22	109.470			
O7	C8	H81	109.470	O7	C8	H81	109.470	H211	C21	O22	109.470			
O7	C8	C9	107.200	O7	C8	C9	107.200	C21	O22	C4	117.800			
H82	C8	H81	107.900	H82	C8	H81	107.900	O22	C4	C3	125.000			
H82	C8	C9	109.470	H82	C8	C9	109.470	O22	C4	C5	115.000			
H81	C8	C9	109.470	H81	C8	C9	109.470	C3	C4	C5	120.000			
C8	C9	H91	109.470	C8	C9	H91	109.470	C4	C3	H3	120.000			
C8	C9	H92	109.470	C8	C9	H92	109.470	C4	C3	C2	120.000			
C8	C9	O10	108.300	C8	C9	O10	108.300	H3	C3	C2	120.000			
Torsionswinkel / °														
O29	C28	C30	H301	175.000	O7	C8	C9	O10	175.000	O16	C15	C26	C25	180.000
O29	C28	N27	C2	175.000	O7	C5	C4	O22	0.000	O16	C15	C14	C23	0.000
C28	N27	C2	C1	175.000	C8	C9	O10	C11	175.000	C14	C15	O16	C17	175.000
N27	C2	C3	C4	180.000	C9	O10	C11	C12	175.000	C15	O16	C17	C18	175.000
N27	C2	C1	C6	180.000	O10	C11	C12	O13	175.000	O16	C17	C18	O19	175.000
C2	C1	C6	C5	0.000	C11	C12	O13	C14	175.000	C17	C18	O19	C20	175.000
C1	C6	C5	C4	0.000	C12	O13	C14	C15	175.000	C18	O19	C20	C21	175.000
C6	C5	C4	C3	0.000	O13	C14	C23	C24	180.000	O19	C20	C21	O22	175.000
C5	C4	C3	C2	0.000	O13	C14	C15	O16	0.000	C20	C21	O22	C4	175.000
C4	C3	C2	C1	0.000	O13	C14	C15	C26	180.000	C21	O22	C4	C5	175.000
C1	C6	C5	O7	180.000	C14	C15	C26	C25	0.000	O22	C4	C5	C6	180.000
C3	C4	C5	O7	180.000	C15	C26	C25	C24	0.000	O22	C4	C3	C2	180.000
C4	C5	O7	C8	175.000	C26	C25	C24	C23	0.000	O16	C15	C26	C25	180.000
C5	O7	C8	C9	175.000	C25	C24	C23	C14	0.000	O16	C15	C14	C23	0.000

8 Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen danke ich für die interessante und vielschichtige Aufgabenstellung, die Betreuung dieser Arbeit und die Freiheit bei der Durchführung derselbigen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Koert für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und die Unterstützung dieser Arbeit.

Großer Dank sei meinen Kollaborationspartnern Dr. Menekşe Çebi und Steffen Brenzel ausgesprochen, die dieses Projekt mit ihren lebhaften Diskussionen, Anregungen und Ideen unterstützt und vorangetrieben haben.

Dr. Philipp Reiß danke ich für die durchgeführten BLM-Messungen, die kooperative Haltung bei der Terminvergabe der BLM-Messzeit sowie für die Hilfestellung bei der Einarbeitung in diese Technik.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. Uwe Linne, der durch seine schnelle, motivierte und ausdauernde Art die massenspektrometrische Analyse der eingereichten Proben ermöglicht hat.

Für die Durchsicht dieses Manuskriptes danke ich den Korrekturlesern Petra Gnau, Holger Webert und Manuel Maestre-Reyna tausendfach.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Petra für die tolle, spaßige Zeit im Labor 3701 sowie die Bereitschaft, regelmäßig auf das Radio zu verzichten.

Holger danke ich für die Freundschaft, die den Horizont der Chemie übersteigt, die Arbeitsgespräche und die (fast) täglichen Telefonate über dieses und jenes.

Für die tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit in Form der Mutagenese und *inclusion bodies*-Präparationen bedanke ich mich bei Sabrina Hölscher, Jennifer Hilberg und Martina Lenz. Ebenso danke ich Wolger Lübben und Wolfgang Große, die ihren Beitrag zu dieser Arbeit aus Sicht der OmpG-Brille beigetragen haben. Zusätzlich danke ich letzterem für konstruktive Anregungen und die Unterstützung dieser Arbeit.

Meinen mehrjährigen Arbeitskreiskollegen sage ich danke für die Hilfe im biochemischen Laboralltag, die Ratschläge, das Teamwork und die nette Atmosphäre. Hier seien besonders Dr. Tobias Klar, Daniel Kreß, Stefan A. Samel, Manuel Maestre-Reyna, Britta Meissner, Maik Veelders und Stephan Kiontke namentlich erwähnt.

Ebenso bedanke ich mich bei den Vertiefungsstudenten Florian Peuckert, Susanne Jilek, Michael Schick, Anastasia Saliskowski und Claudia Rullich, die einzelne Schritte bei der Durchführung dieser Arbeit mitbegleitet haben.

Pippi und Annika danke ich für die Bildung des Triumvirats und den sich daraus ergebenden Freuden des Alltags.

Last, but *definitely* not least, danke ich meinen Eltern und Geschwistern, die durch ihre langjährige Unterstützung und Anteilnahme diese Arbeit gefördert und realisiert haben, sowie meiner Frau Dinah, die mich immer unterstützt, motivierend und freiraum-schenkend begleitet hat. Ich danke dir, mein Schatz.